

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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44579">https://hdl.handle.net/11094/44579</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

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

2003 年

石 野 園 子

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

2003 年

石 野 園 子

# 目次

緒論	1
本論	5
第一章 クランプ(PCNA)とクランプローダー(RFC)の生化学的解析	5
第一節 クランプ (PCNA) の精製	5
第二節 クランプローダー (RFC) の精製	7
第三節 クランプ(PCNA)とクランプローダ(RFC)の分子機能解析	10
第四節 考察	18
第二章 クランプ(PCNA)とクランプローダー(RFC)の立体構造と機能	21
第一節 クランプ (PCNA) の立体構造	21
第二節 クランプローダー (RFC) の立体構造	22
第三節 考察	24
第三章 DNA複製因子における分子間相互作用の解析	27
第一節 PCNA結合タンパク質とPCNAの相互作用の解析	27
第二節 RFCSの変異体の機能解析	34
第三節 考察	39
結論	42
謝辞	44
実験の部	45
引用文献	56

## 緒論

DNA 複製、修復、組換えなどの生命現象は遺伝子の本体であるゲノムの安定維持と生命の存続にとって重要な働きを担い、生命体細胞内で極めて巧妙に制御されている。これらの適切な働きが崩れると疾患が現れ、死を招くことにもつながる。したがって、これらの過程に関わるタンパク質の分子認識機構のコアになる部分を解明することは、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。しかしながら、最近の酵母やヒトでの研究成果からわかることは、いかに多くの因子がこれらの過程に関係し合い、高度に複雑化した分子機構を形成しているかということであり(1, 2)、全容の解明が容易ではないことは明らかである。

古細菌（アーキア、archaea）は第三の生物といわれ(3)、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を含めて、進化的に大変興味深い生物である (Fig. 1)。著者は、

DNA 複製の分子機構に興味を持ち、古細菌を対象に研究し、それらを真

正細菌や真核生物のものと比較していくことによって、DNA 複製装置の原始的な形を理解するとともに、古細菌をモデルとして複雑化した高等真核生物における DNA の複製過程の分子認識機構を解明していくことができるのではないかと考えた。さらに、関与するタンパク質因子について機能と構造の関係を分子レベルで理解するためには、高純度に精製した標品について物理化学的に構造解析することが重要と考え、より構造解析に適した安定なタンパク質が調製できる超好熱古細菌を用いた。

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

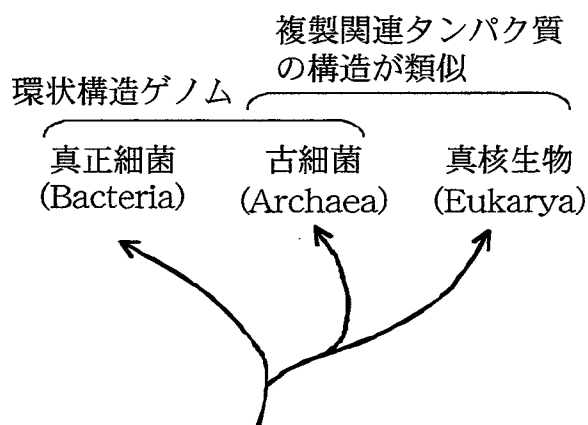
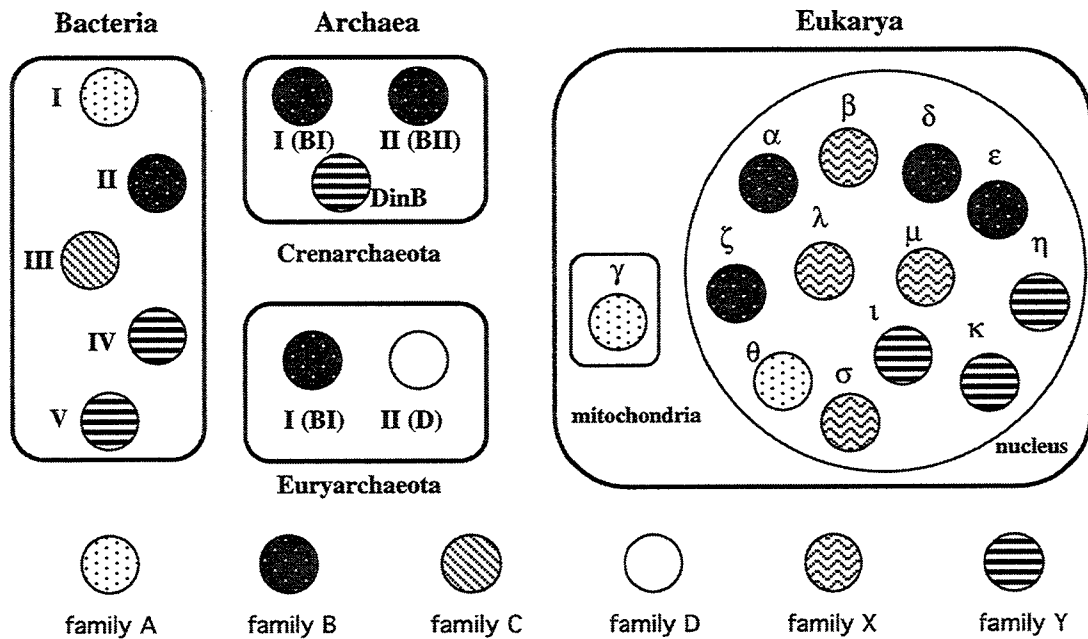


Fig. 1. Three domains of life.

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(4-10)。

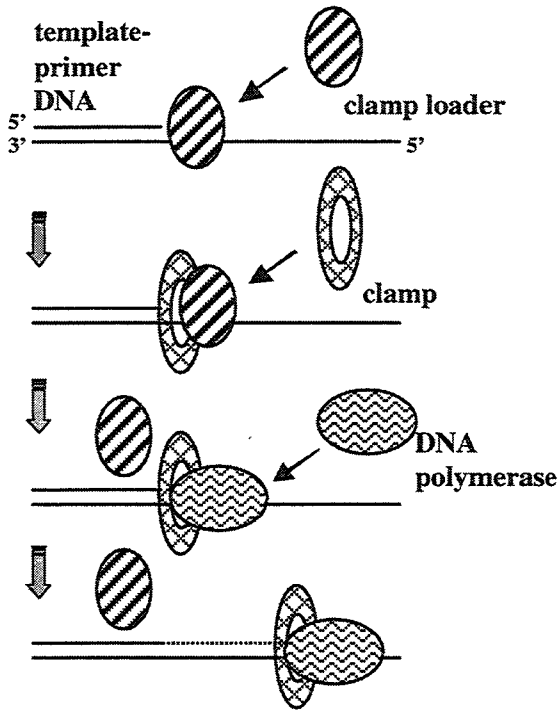


**Fig. 2. DNA polymerases in three domains.**

DNA 複製の主役は、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を基質にして DNA 鎖を合成する DNA ポリメラーゼである。これまでの研究より生物は一つの細胞内に複数種の DNA ポリメラーゼを有することが知られており、通常の染色体 DNA 複製をつかさどる酵素や、様々な修復過程にかかわる酵素などそれぞれ特有の役割を分担している。近年、塩基部分に損傷が入った DNA 鎖を鋳型として、損傷部分を乗り越えて合成する活性(translesion synthesis)を有する DNA ポリメラーゼが相次いで発見されたことと、ゲノムプロジェクトによって多くの生物の全ゲノム配列が明らかになってきたことにより、DNA ポリメラーゼの種類は急激に増加した。DNA ポリメラーゼはいくつかの共通するアミノ酸配列によって Fig. 2 に示すように6つのファミリーに分類することができる(11)。通常の染色体 DNA 複製過程に働く酵素は真正細菌では PolIII、真核生物では Polα、Polδ、Polεであることが知られており、それぞれ異なるいくつかのサブユニットが複合体を形成して働いている。その中の触媒サブユニットのアミノ酸配列から PolIII はファミリーCに、Polα、Polδ、Polε

はファミリー B に分類されている。Pol $\epsilon$  は同じように真核生物の核内に存在しファミリー B に共通するアミノ酸配列を持った酵素であるが、修復酵素であることがわかっている。

一方古細菌は、系統的に大きく二つのサブグループ（クレナーキオタ (Crenarchaeota) 及びユリアーキオタ (Euryarchaeota)）に分けることができるが、クレナーキオタには少なくとも 2 つ（ある種では 3 つ）のファミリー B 酵素 (PolBI, PolBII, (PolBIII)) が、また *P. furiosus* を含むユリアーキオタにはファミリー B、ファミリー D に属する酵素 (PolBI, PolD) がそれぞれ 1 つずつ存在し、それぞれの酵素の有する生化学的特性から、各々が染色体 DNA 複製に関与していると考えられている (12)。



**Fig. 3. Mechanism of processive DNA synthesis.**

鋳型 DNA に従って新生鎖が合成される DNA 複製の伸長過程は、次のようなモデルが提唱されている。複製を担う DNA ポリメラーゼが鋳型 DNA 鎖上からこぼれ落ちずに、連続的に効率のよい DNA 合成を行うためには、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。クランプはドーナツ型の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 (13、14)。DNA 鎖がクランプの輪の中に組み込まれるためには、リング構造が一度開く必要があり、そのためにクランプローダー

とよばれる分子が働く (Fig. 3)。真正細菌では大腸菌 DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素として同定された 10 種類のサブユニット構造のうち、 $\beta$ サブユニットがクランプであり、5 種類 ( $\gamma, \delta, \delta', \chi, \psi$ ) からなる  $\gamma$  複合体がクランプローダーの役目をは

たす。一方真核生物では、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 (Table 1)。

**Table 1. Proteins in the processive DNA synthesis.**

<b>function</b>	<b>Bacteria</b>	<b>Archaea</b>	<b>Eukarya</b>
<b>DNA synthesis</b>	<b>Pol III</b>	<b>Pol BI, Pol BII, Pol D</b>	<b>Pol <math>\alpha</math>, Pol <math>\delta</math>, Pol <math>\epsilon</math></b>
<b>clamp</b>	<b>Pol III <math>\beta</math>-subunit</b>	<b>PCNA</b>	<b>PCNA</b>
<b>clamp loader</b>	<b>Pol III <math>\gamma</math>-complex</b>	<b>RFC (small, large)</b>	<b>RFC (5 subunits)</b>

古細菌の DNA 複製研究は、ポリメラーゼ以外は、最近までほとんどなされてなく、伸長過程の因子についても全く知られていなかった。最近のゲノム配列解析の結果から、古細菌ゲノム中に真核生物の PCNA、RFC に似た配列を持つタンパク質をコードする遺伝子が存在することが見出された。著者は、超好熱古細菌の一種である *P. furiosus* のゲノム DNA から PCNA、RFC 様配列をコードする遺伝子をクローニングし、それらの遺伝子産物がそれぞれクランプ、クランプローダー活性を有することを示すと共に、*P. furiosus* 由来の DNA ポリメラーゼ、クランプ、クランプローダーがどのように相互作用し、連続的で効率のよい (processive) DNA 合成を実現するのかという点に興味を持ち、これらの分子の生化学的解析および構造生物学的解析を行った。

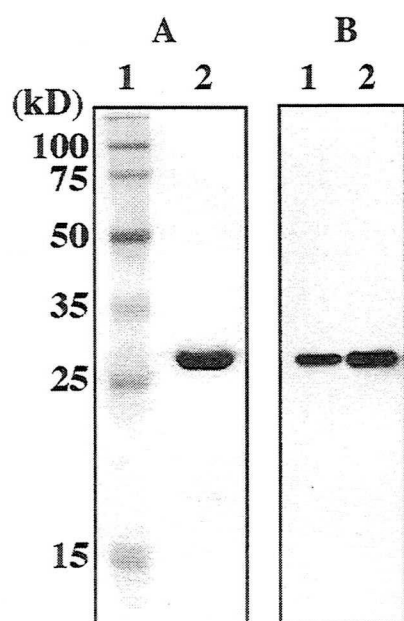


## 本論

### 第一章 クランプ (PCNA) とクランプローダー (RFC) の生化学的解析

#### 第一節 クランプ (PCNA) の精製

*Pyrococcus* 属の中で最初にゲノム情報が公開された *Pyrococcus horikoshii* の全ゲノム配列中に (15)、真核生物の PCNA と類似配列を持つタンパク質をコードする遺伝子を見出した。その遺伝子配列をもとにプライマーを設計し PCR 法により *P. furiosus* ゲノム DNA から類似配列をコードする配列を増幅させた。得られた遺伝子は 249 残基のアミノ酸からなる分子量 28,000 のタンパク質をコードしていた。この遺伝子がコードするアミノ酸配列はヒト PCNA, 酵母 PCNA とそれぞれ 22 %, 25 % の一致で相同性を示した。古細菌由来の PCNA のアミノ酸配列と比較すると、*Methanothermobacter thermoautotrophicus* (16)、*Archaeoglobus fulgidus* (17)、および *Methanococcus jannaschii* (18)、との間にそれぞれ 30, 24, 39 % の一致でアミノ酸配列の相同性が見られた。この遺伝子を発現用ベクター、pET21a にクローニングし、大腸菌で発現させて目的タンパク質 (*Pfu*PCNA) を大量に産生させた。精製条件を種々検討した結果、細胞粗抽出液を熱処理 (80 °C, 10 分) した後、polyethyleneimine による除核酸処理、硫酸アンモニウム沈澱、および陰イオン交



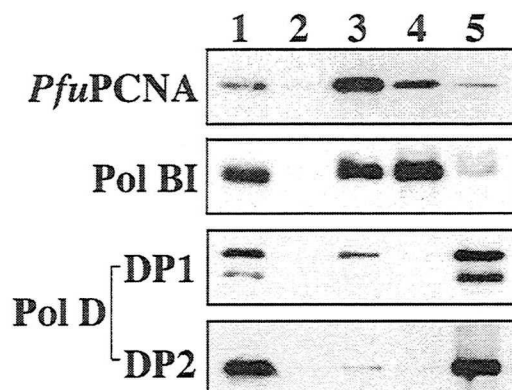
**Fig. 4. Purification of recombinant *Pfu*PCNA from *E. coli* cells and identification of *Pfu*PCNA in *P. furiosus* cells.** (A) Recombinant *Pfu*PCNA purified as described in the text was loaded onto an SDS-12.5 % polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: 1, molecular mass markers (Perfect Protein Markers; Novagen); 2, purified *Pfu*PCNA (3 µg). The sizes of the molecular mass markers are indicated on the left. (B) Western blot analysis of *Pfu*PCNA. *P. furiosus* cell extracts (35 µg of the cells) and recombinant *Pfu*PCNA (10 ng) produced in *E. coli* were separated by SDS-12.5% PAGE and then analyzed by Western blotting with anti *Pfu*PCNA antiserum. Lanes: 1, *P. furiosus* cell extract; 2, recombinant *Pfu*PCNA

換カラムクロマトグラフィーにより、*PfuPCNA* を高純度に精製することに成功した (Fig. 4A)。

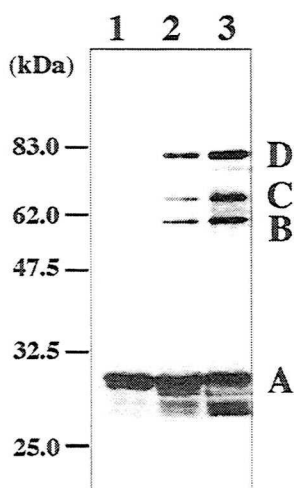
この精製 *PfuPCNA* を用いてウサギを免疫し、得られた抗血清を用いてウェスタンブロット法により分析を行った結果、*P. furiosus* の細胞粗抽出液中には大腸菌で産生させたタンパク質と等しい大きさのタンパク質が存在していることがわかった (Fig. 4B)。また免疫沈降実験により、*P. furiosus* の細胞粗抽出液中では PolBI, PolD の両酵素ともに抗 *PfuPCNA* 抗体によって *PfuPCNA* とともに沈澱することがわかり、両 DNA ポリメラーゼが *PfuPCNA* と相互作用していることが示唆された (Fig. 5)。

*PfuPCNA* は、ゲルろ過クロマトグラフィーで分子量約 75,000 の画分に溶出され

二量体または三量体を形成することが予想された。そこで *PfuPCNA* の複合体形成を調べるため化学的クロスリンク法を試みた。EGS(ethylene glycol-bis(succinimidyl succinate))を *PfuPCNA* に作用させたところ、Fig. 6 の SDS-



**Fig. 5. Immunoprecipitation analysis of DNA polymerase-*PfuPCNA* interaction.** Total cell extracts were precipitated with anti-*PfuPCNA*(lane 3), anti-Pol BI(lane 4), anti-DP1(lane 5). The total cell extracts without immunoprecipitation (lane 1) or precipitated with PBS-treated protein A-Sepharose (lane 2) were loaded as controls. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE and then analyzed by Western blotting using indicated antibodies.



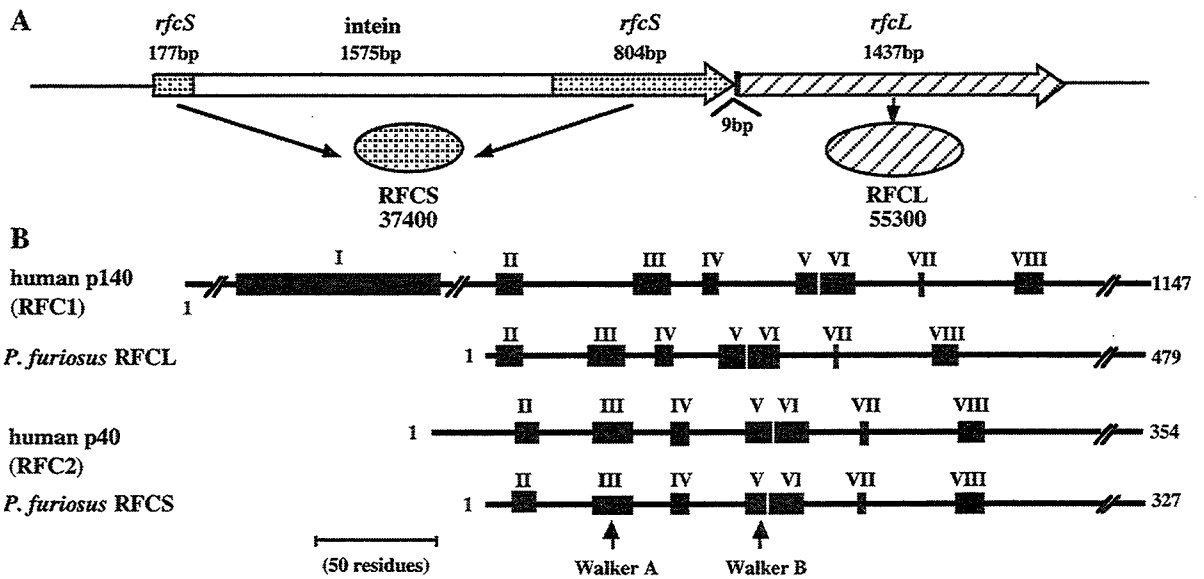
**Fig. 6. Association state of *PfuPCNA* protein as revealed by chemical cross-linking.** *PfuPCNA* was treated with EGS for 10 s (lane 2) and 1 min (lane 3) and analyzed by SDS-10 % PAGE, followed by Western blot analysis. The protein without treatment EGS is shown in lane 1. Each band is derived from *PfuPCNA* monomer (A), a single cross-linked dimer (B), three cross-linked circled trimers (C), and two cross-linked linear trimers, as indicated for the T4 gp45 protein. Indicated molecular sizes were derived from Prestained Protein Marker (New England Biolabs).

PAGE の解析結果にみられるように、複合体分子と思われる高分子量産物が形成された。これらの産物は T4 ファージ由来のクランプ、gp45 タンパク質で示されたように (19)、一箇所が架橋された二量体、二箇所架橋された線状三量体、および三箇所架橋された環状三量体であると推定された。ゲルろ過クロマトグラフィーによって *Pfu*PCNA が計算上分子量約 75,000 の画分に溶出されることについては、*Pfu*PCNA サブユニット間の相互作用が強固なものではなく、比較的容易に構造変化を起こしうるため、混合物として分子量約 75,000 をピークとする広い範囲に溶出されるのではないかと考えられる。あるいはゲル担体とタンパク質の非特異的な結合が存在するかもしれない。

## 第二節 クランプローダー (RFC) の精製

真核生物の DNA 複製において、RFC はクランプローダーとして機能し ATP の加水分解に依存して、①鋳型 DNA 上のプライマーを認識し、②リング状タンパク質 PCNA と結合して PCNA を開環させ、③鋳型 DNA へ PCNA をはめ込む、といった役割を持つ。真核生物の RFC は 1 個の大サブユニットと 4 種類の小サブユニット (配列には全て相同性がある) から構成されるヘテロ五量体であるが (20)、古細菌においてゲノム配列を比較したところ相同性を示す部分が存在し、それより大小二種類のタンパク質が存在することがわかった。古細菌由来の RFC のアミノ酸配列を種々の真核生物由来 RFC のアミノ酸配列と比較すると、N-末端側に RFC ボックス II-VIII と呼ばれる共通セグメントが見出された (Fig. 7B)。この RFC ボックスには ATP 加水分解に重要とされる配列 (Walker A モチーフ、Walker B モチーフ) が含まれていた。ボックス I はまたリガーゼモチーフとして知られるが、このボックス I は真核生物由来の RFC 大サブユニットのみに見られる。*P. furiosus* 由来 RFC 小サブユニットのアミノ酸配列を他の古細菌由来の RFC 小サブユニットのアミノ酸配列と比較すると、*Aeropyrum pernix* (21)、*M. thermoautotrophicus* (16)、*A. fulgidus* (17)、および *M. jannaschii* (18)、との間にそれぞれ 58, 58, 59, 69 % の一致でアミノ酸配列の相同性がみられた。真核生物由来の RFC 小サブユニットのアミノ酸配列に対しては、*Saccharomyces cerevisiae* の RFC4 および RFC2 とはそれぞれ 42 および 39 %、また human の RFC40 および RFC37 とは 41 および 40 %

のアミノ酸配列の一致がみられた。RFC 大サブユニットでは *P. furiosus* と他の古細菌の間で 29 % (*M. thermoautotrophicus*)から 37 %(*M. jannaschii*) のアミノ酸配列の一致があった。真核生物由来の RFC 大サブユニットのアミノ酸配列では、ボックス II 以降を比較すると *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans* とそれぞれ 10, 18, 18, 19 %の一致で相同性がみられた。



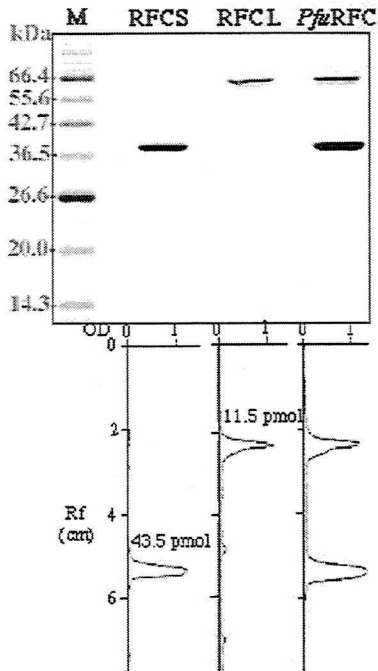
**Fig. 7. Gene organization and amino acid sequence comparison of *Pfu*RFC with human RFC.** (A) The genes for RFCS and RFCL are arranged in tandem on the *P. furiosus* genome. Open reading frames are indicated by the large arrows with each encoded product. An intein gene is inserted into the site for Walker A motif of RFCS. (B) Amino acid sequences of RFCS and RFCL are compared with those of the human RFC subunits. The conserved RFC boxes are indicated by closed boxes and are numbered at the top. The amino acid lengths of each subunit are indicated on the right, Walker A and B motifs characteristic for NTP binding proteins are involved in boxes III and V, respectively.

*P. furiosus* ゲノム上では RFC 小サブユニットと大サブユニットをコードする遺伝子は連続して存在し、オペロン構造をとっていると思われる。また、小サブユニットに対する遺伝子では Walker A モチーフを分断するようにインテイン遺伝子が挿入されていた (Fig. 7A)。そこで著者は二つの *P. furiosus* RFC 遺伝子を別々にクローニングし、小サブユニットでは PCR 法によりインテイン配列を除いて、エキ

ステインを連続した遺伝子としてクローニングした。得られた小サブユニットの遺伝子は 327 残基のアミノ酸からなる分子量 37,400 のタンパク質を、大サブユニットの遺伝子は 479 残基のアミノ酸からなる分子量 55,300 のタンパク質をそれぞれコードしていた。小サブユニットの遺伝子を発現用ベクター、pET21a にクローニングし、大腸菌で発現させて目的タンパク質 (RFCS; small) を大量に産生させた。種々条件を検討した結果、熱処理、polyethyleneimine による除核酸処理、硫酸アンモニウム沈澱、およびハイドキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、RFCS タンパク質を高純度に精製することに成功した。大サブユニットの遺伝子は発現用ベクター、pET28a にクローニングし、大腸菌で発現させて目的タンパク質 (RFCL; large) を大量に産生させた。このタンパク質は N-末端に 6 残基のヒスチジンを Tag として有し、これを利用してコバルトキレートアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。それぞれの精製タンパク質の濃度決定は 6 M グアニジン塩酸で変性し 280nm の吸光度を測定して行った。モル吸光係数はタンパク質中のトリプトファン、チロシンおよびシステインの残基の数に基づいて計算し、RFCS を  $19,300\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、RFCL を  $66,000\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  とした(22)。

RFCS と RFCL の複合体を形成させるため、真核生物における RFC の構成比、小サブユニット : 大サブユニット (4:1) を参考にして、RFCS/RFCL をモル比 5 以上で混合し 60 °C で 20 分処理しておこなった。複合体画分は陰イオン交換カラムクロマトグラフィーとヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製できた。ゲルろ過クロマトグラフィーではこの精製 *Pfu* RFC は分子量約 250,000 の画分に溶出された。また、RFCL は単独で扱おうと非特異的な会合 (アグリゲーション) を起こしやすいことがわかったが、RFCS は単独でも安定な重合体を形成しており、分子量 150,000 の画分に溶出された。

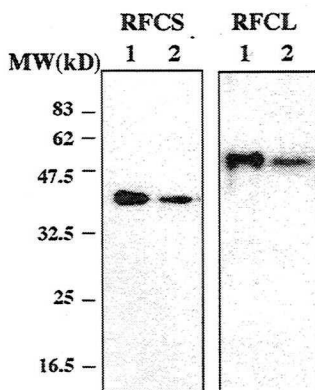
精製した RFCS、RFCL および *Pfu* RFC のゲル電気泳動を行い Coomassie Brilliant Blue 染色してそのバンド強度をデンストメトリーで分析し、既知濃度の各々の精製標品をもとに検量線を作成することによって、RFCS と RFCL が 4 : 1 のモル比で会合していることを予想した (Fig. 8)。これは試験管内で再構成させた複合体の場合であり、実際の細胞における構成比は不明である。



**Fig. 8. Purification of recombinant RFCS, RFCL, and *PfuRFC* from *E. coli* cells.**

Recombinant proteins purified as described in the text were loaded onto an SDS-12 % polyacrylamide gel, which was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane M indicate the molecular size maker (New England Biolabs). The gel was scanned with a PDI 420oe Densitometer and each band on the gel was quantitated using the Quantity One software.

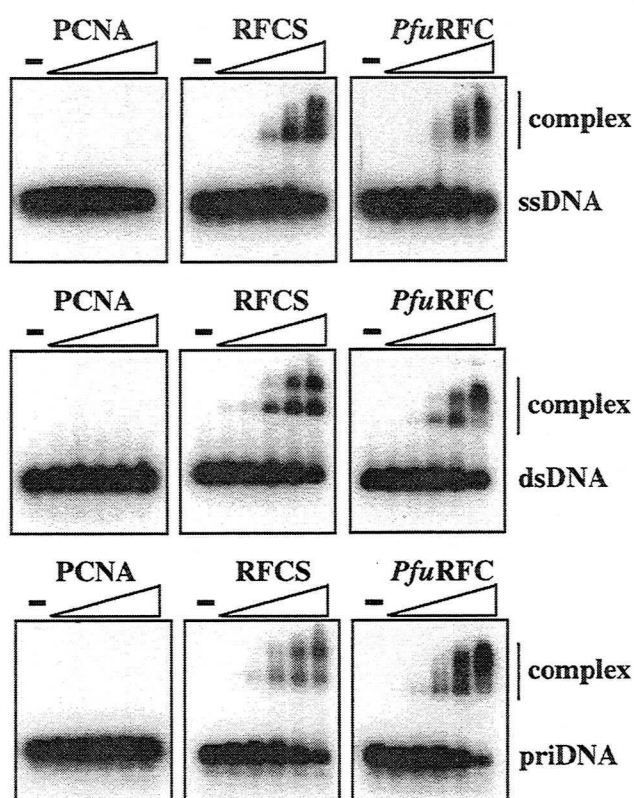
精製した RFCS および RFCL タンパク質でウサギを免疫して得られた抗血清を用いてウェスタンブロット法により分析を行った結果、*P. furiosus* の細胞粗抽出液中には大腸菌で産生させたタンパク質と等しい大きさのタンパク質がそれぞれ存在していることがわかった (Fig. 9)



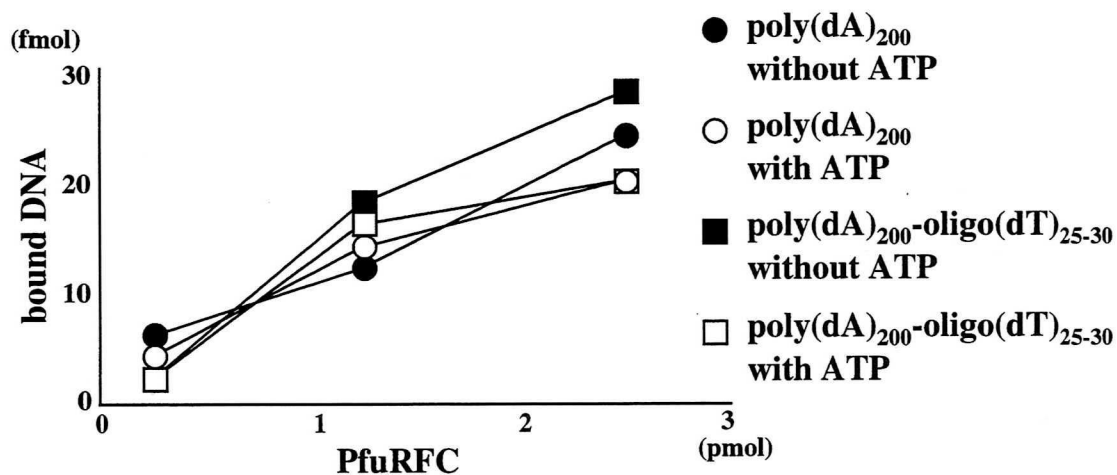
**Fig. 9. Identification of RFCS and RFCL in *P. furiosus* cells.** *P. furiosus* cell extracts (2.5  $\mu$ g of cells for RFCS and 300  $\mu$ g of cells for RFCL) and purified RFCS (0.25 ng) or RFCL (15 ng) were separated by SDS-12 % PAGE. These gels were subjected to Western blot analyses with anti-RFCS and anti-RFCL antisera, respectively. Lanes: 1, recombinant RFCS or RFCL; 2, *P. furiosus* cell extract.

### 第三節 クランプ (PCNA) とクランプローダー (RFC) の分子機能解析

*PfuRFC* と *PfuPCNA* の DNA 結合活性を調べるため、ゲルシフトアッセイを行った (Fig. 10)。一本鎖、二本鎖、およびプライマー構造 (一本鎖部分と二本鎖部分を有する) のデオキシオリゴヌクレオチドをアイソトープラベルし、*PfuPCNA*、RFCS



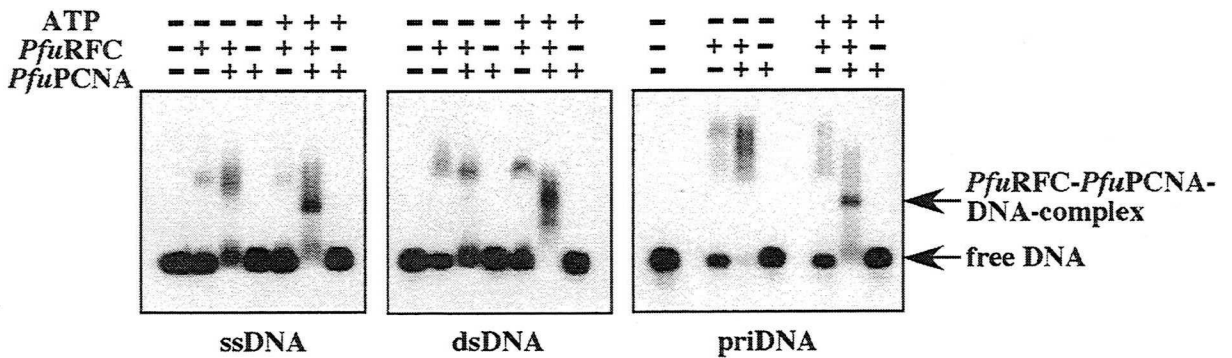
**Fig. 10. DNA binding activities of PCNA, RFCS, and *PfuRFC* analyzed by gel retardation assay.** Various concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100, 200 nM) of proteins were incubated with 5 nM  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA (49-mer as ssDNA, 49/49-mer as dsDNA, or 49/27-mer as primed DNA) at 60 °C for 10min. The reaction products were analyzed by 1 % agarose gel electrophoresis followed by autoradiography. The left lane in each panel shows the reaction without protein.



**Fig. 11. DNA binding activities of *PfuRFC* analyzed by filter binding assay.** The reaction mixtures using  $^{32}\text{P}$ -labeled poly(dA)<sub>200</sub> or poly(dA)<sub>200</sub>-oligo(dT)<sub>25-30</sub> were subjected to a nitrocellulose filter binding assay. The protein-bound DNA trapped on the filter was quantified by scintillation counting.

および *PfuRFC*(4×RFCS+1×RFCL)を様々な濃度で混合して、ゲル電気泳動を行い、バンドシフトを観察して結合活性を調べた。*PfuPCNA* 単独では DNA 結合活性が見られなかった。RFCS と *PfuRFC* には同程度の DNA 結合活性が見られ、DNA の形状による差が見られなかった。またこれらの反応では ATP の有無による差も見られなかった。また別の手法としてフィルターバインディングアッセイを *PfuRFC* について行なったが、DNA 結合活性は、ゲルシフトアッセイの結果と同様であった (Fig. 11)。

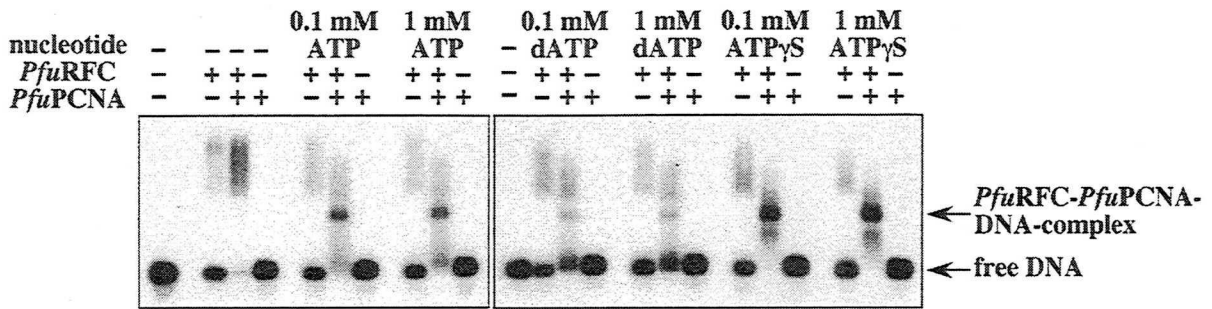
しかし *PfuRFC* と *PfuPCNA* を ATP 存在下で DNA に作用させると、いずれの DNA の場合でも安定な *PfuRFC*-*PfuPCNA*-DNA 複合体を形成することがゲルシフトア



**Fig. 12. Effect of ATP on DNA binding activities of PCNA, and *PfuRFC*.** Fifty nM of proteins and 5 nM <sup>32</sup>P-labeled DNA (49-mer as ssDNA, 49/49-mer as dsDNA, or 49/27-mer as primed DNA) were incubated with or without ATP at 60 °C for 10 min. The reaction products were analyzed by 1 % agarose gel electrophoresis followed by autoradiography.

ッセイによりわかった (Fig.12)。*PfuRFC*-*PfuPCNA*-DNA 複合体の移動度が *PfuRFC*-DNA 複合体より大きくなったことについては、*PfuPCNA* が負に強く荷電しているため、*PfuPCNA* が結合することにより複合体全体としての負の電荷が強くなり、移動度が大きくなったと考えられる。複合体形成に対するヌクレオチドの影響を ATP、dATP、および ATP $\gamma$ S で比較したところ、いずれの場合も複合体を形成するが、ATP $\gamma$ S 存在下でもっとも安定に形成された (Fig.13)。抗 RFCS 抗体および抗 *PfuPCNA* 抗体をこの結合反応液に添加した時、スーパーシフトバンドは見られ

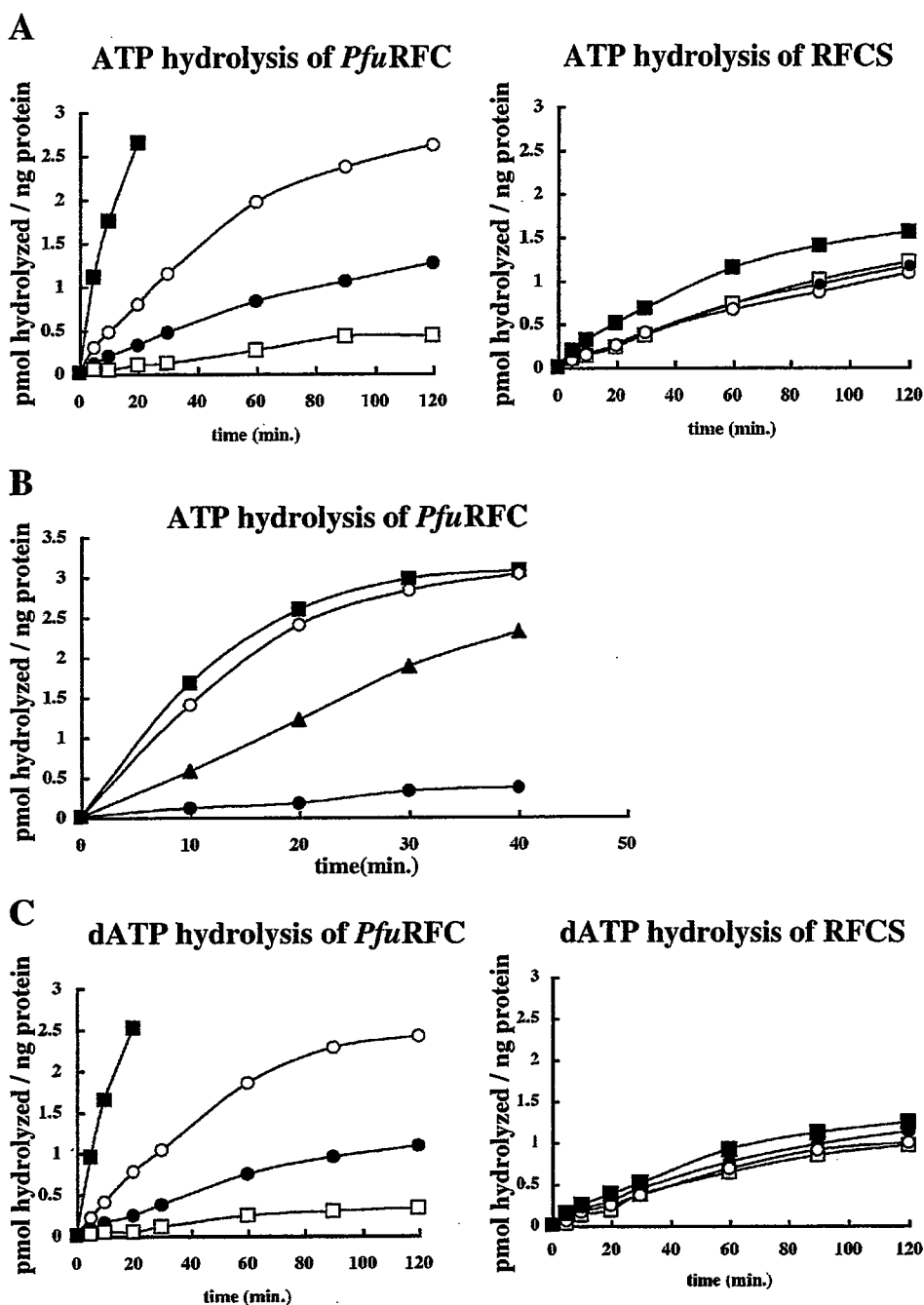




**Fig. 13. Effects of nucleotides on DNA binding activities of PCNA, and *PfuRFC*.** Fifty nM of proteins and 5 nM <sup>32</sup>P-labeled DNA (49/27-mer) were incubated with or without ATP, dATP, and ATP $\gamma$ S at 60 °C for 10 min. The reaction products were analyzed by 1 % agarose gel electrophoresis followed by autoradiography.

なかったが、フリーの DNA バンドも消失したことからアグリゲートしたことが想像され、ネガティブコントロールとして用いたプライマーゼサブユニット p41 に対する抗体の場合は変化がないという結果が得られたので、Fig.12 および Fig.13 で検出されたシフトバンドは *PfuRFC-PfuPCNA-DNA* 複合体であると考えられる (data not shown)。

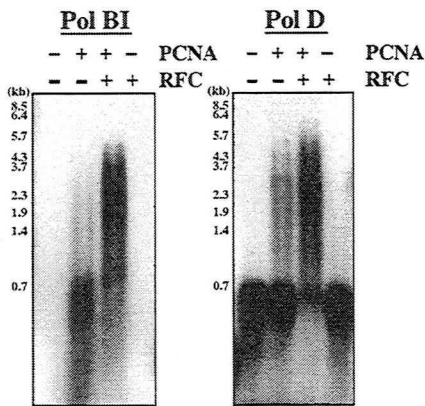
真核生物では PCNA を DNA 上にローディングするために ATP の加水分解が必要と考えられている。そこで RFCL、RFCS および *PfuRFC* について ATP 加水分解活性を測定した。RFCL はアミノ酸配列上 Walker A モチーフと Walker B モチーフがあり ATP 加水分解活性を有することが予想されたが、溶液中でアグリゲーションを起こすためか、活性を検出できなかった。RFCS および *PfuRFC* ではタンパク質のみでは活性は同程度であるが、DNA を加えることにより *PfuRFC* の活性は 1.5~2 倍に促進され、さらに *PfuPCNA* が加わると約 10 倍~15 倍に促進された (Fig. 14A)。添加する DNA の形状では二本鎖に比べて一本鎖やプライマー構造の方が強い促進効果が見られた (Fig. 14B)。また基質として ATP の代わりに dATP を用いた時にもほぼ同程度の加水分解活性が見られた (Fig. 14C)。これらのことは、*PfuRFC*、*PfuPCNA*、DNA 間の相互作用が ATP および dATP の加水分解活性と密接に関係していることを示している。先のゲルシフトアッセイで定性的に観察された結果では、*PfuRFC-PfuPCNA-DNA* 複合体は、dATP より ATP を用いた場合の方が安定であ



**Fig. 14. ATP/dATP hydrolyzing activities of *PfuRFC* and RFCS.** The RFCS or *PfuRFC* protein (each at 300ng), [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]ATP or [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dATP (0.05 mCi/ml), and 0.1 mM ATP or dATP were incubated with or without DNA and *PfuPCNA* at 65°C for indicated times. Aliquots of the reactions were analyzed by thin-layer chromatography, and the amount of hydrolyzed ATP or dATP were quantified from the autoradiogram using a laser excited image analyzer. The graphs show the values after subtraction of the background. (A) Effects of DNA and *PfuPCNA* on the activity. Symbols: closed circular, *PfuRFC* or RFCS protein only; open circular, with ssDNA; open square, with *PfuPCNA*; closed square, with ssDNA and *PfuPCNA*. (B) Dependency of stimulation on the DNA structure in the presence of *PfuPCNA*. Symbols: closed circular, *PfuRFC* only; closed triangle, with dsDNA; open circular, with ssDNA; closed square, with priDNA. (C) dATPase activity of RFCS and *PfuRFC*. Symbols are as described for panel A.

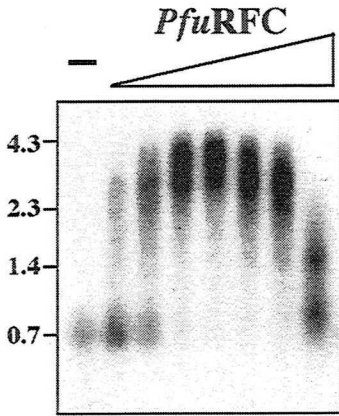
り、また加水分解を受けにくい ATP $\gamma$ S の存在下でもっとも安定であった。クランプローディングの機構と ATP および dATP の加水分解活性の関係の解明には、さらに詳細な解析が必要であると考えられる。

*P. furiosus* には DNA 複製酵素と考えられる PolBI, PolD の二つの DNA ポリメラーゼが存在する。そこでそれぞれの酵素による DNA 合成反応に *Pfu*PCNA および *Pfu*RFC を加えてその効果を調べた。環状一本鎖 DNA を鋳型に用いてプライマーの伸長反応を行った。PolBI の DNA 鎖伸長活性は *Pfu*PCNA を加えることで明らかに促進された。また、PolD は PolBI に比べて本来の伸長活性が高い酵素であるが、この PolD においても *Pfu*PCNA による DNA 鎖伸長活性の促進がみられた(Fig. 15)。



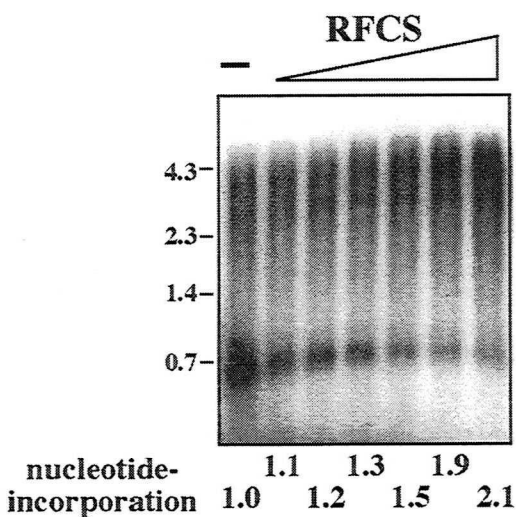
**Fig. 15. Effects of *Pfu*PCNA and *Pfu*RFC on the DNA synthesis of *P. furiosus* Pol BI and Pol D.** The primer extension abilities of Pol BI and Pol D were compared with M13 single stranded circular DNA as the template in the presence or absence of *Pfu*PCNA and *Pfu*RFC. The reaction mixtures were analyzed by 1% alkali agarose gel electrophoresis, and the products were visualized by autoradiography. The size indicated on the left was from *Bst*PI-digested  $\lambda$  phage DNA labeled by  $^{32}$ P at each 5' end.

真核生物のモデルでは、PCNA を DNA 鎖にはめ込むためには、そのリング構造を一度開く必要があり、RFC-PCNA 複合体が ATP の結合と加水分解を伴って構造変化を起こし、PCNA を開環させると考えられている。ところが、*P. furiosus* の場合、環状一本鎖 DNA を鋳型に用いたときのポリメラーゼ (PolBI, PolD) による DNA 合成活性が、*Pfu*PCNA のみを加えることにより促進された。このことは、*in vitro* において *Pfu*PCNA はローダーを必要とせずにある程度は DNA 鎖上に正しく乗る (self-loading する) ことができることを示している。*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(Fig.15、Fig.16)。したがって、*in vitro* では *Pfu*PCNA は単独でも DNA 上に乗ることができるが、細胞中では *Pfu*RFC がクランプローダーとして働き、効率よく *Pfu*PCNA を



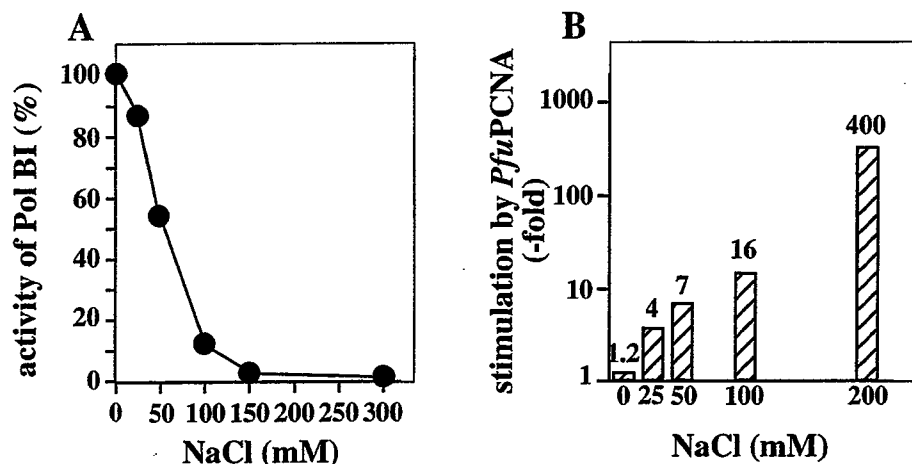
**Fig. 16. Effect of *PfuRFC* on the *PfuPCNA*-dependent DNA synthesis of Pol BI.** The primer extension ability of 0.3 U Pol BI with 20 nM *PfuPCNA* was detected with M13 single-stranded circular DNA as the template in the presence or absence of *PfuRFC*. The reaction mixtures were analyzed by 1 % alkaline agarose gel electrophoresis, and the products were visualized by autoradiography. The amount of *PfuRFC* added to the reaction was 0, 2, 4, 10, 20, 30, 40, and 80 nM

DNA 上にローディングしていると考えられる。また、この反応で用いたプライマーの結合部位から約 700base 下流では鑄型の 2 次構造による DNA 鎖伸長阻害が生じたが、*PfuRFC* を加えると、この箇所を超えて合成された産物が多く観察された。このことから、*PfuRFC* は効率良く *PfuPCNA* のローディングとアンローディングを行なうことによって、伸長阻害を乗り越えていると考えられる。また RFCS だけでも、弱いながらも *PfuPCNA* 依存的な DNA 鎖伸長活性を促進できることがわかった(Fig. 17)。

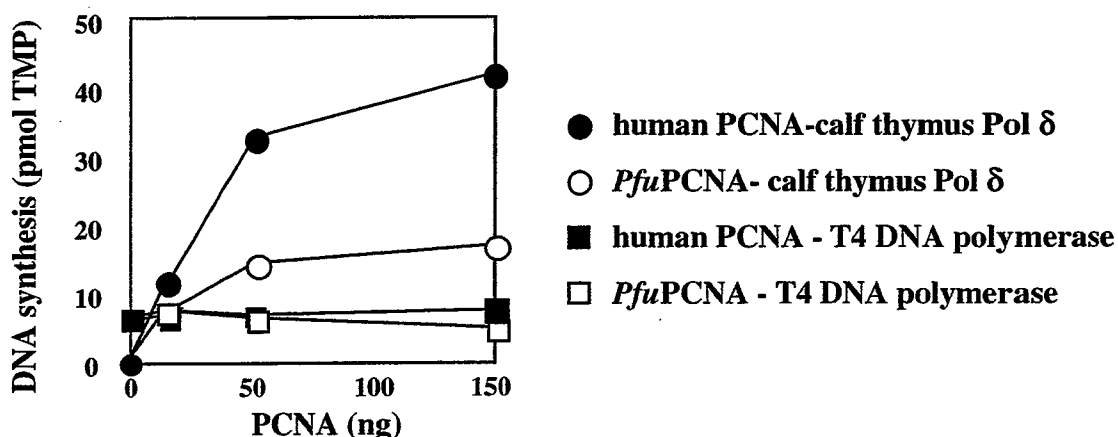


**Fig. 17. Effect of RFCS on the *PfuPCNA*-dependent DNA synthesis of Pol BI.**

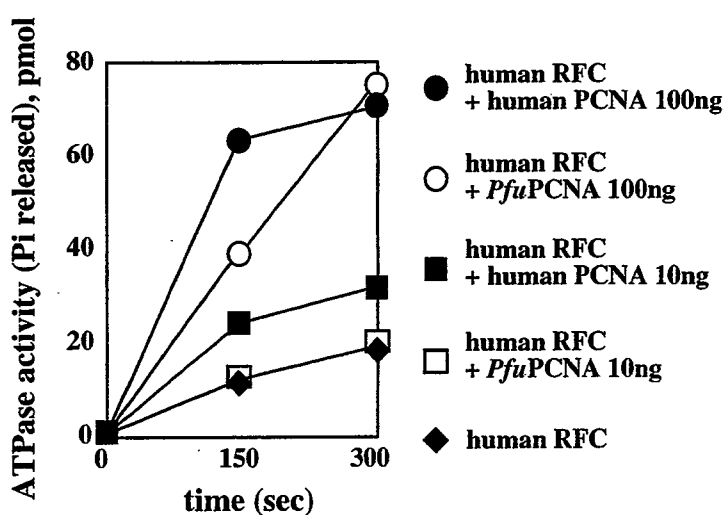
Various concentrations (0, 3, 10, 20, 120, 500, 1000 nM) of RFCS were added in the primer extension reaction of Pol BI with M13 single-stranded circular DNA as the template in the presence of 80 nM of *PfuPCNA*. The reaction mixtures were analyzed by 1 % alkaline agarose gel electrophoresis, and the products were visualized by autoradiography. The relative activities of the nucleotide-incorporation are shown in the bottom line. An aliquot of each reaction mixture using [ $^3\text{H}$ ]dTTP was spotted onto DE81 paper and the acid-insoluble materials were measured by a scintillation counter.



**Fig. 18. Salt sensitivity of *P. furiosus* Pol BI and the effect of *Pfu*PCNA on its primer extension ability.** (A) The amounts of nucleotide incorporation into the DNA strand by Pol BI were compared at various NaCl concentrations in the absence of *Pfu*PCNA and the relative activities (%) to that at 0 mM NaCl were shown by polygonal line. (B) Stimulation of the activity by *Pfu*PCNA at each salt concentration was indicated by bar as relative activities (-fold) to those without *Pfu*PCNA.



**Fig. 19. Stimulation of Pol  $\delta$  activity with *Pfu*PCNA.** DNA synthesis was measured with poly(dA)/oligo(dT), calf thymus Pol  $\delta$  and the indicated amounts of human PCNA or *Pfu*PCNA at 37°C for 15 min. As a control experiment, T4 phage DNA polymerase was used instead of Pol  $\delta$ .



**Fig. 20 Stimulation of human RFC ATPase with human PCNA and *Pfu*PCNA.** The reaction mixture (10  $\mu$ l) of ATPase assay containing 50 pmol poly dA/oligo dT (5:1), 50 ng human RFC and 0.1 M NaCl were added with indicated amounts of human PCNA or *Pfu*PCNA and incubated at 37 °C. Two  $\mu$ l portions of the mixtures were withdrawn at indicated times and released Pi was measured. The results calculated as 10 $\mu$ l reaction mixtures were indicated.

また *PfuPCNA* による促進効果は NaCl 濃度に依存することがわかった。Fig. 18 に示すように PolBI の DNA 合成活性は NaCl により強く阻害を受けるが、*PfuPCNA* により DNA 合成活性が回復する。50 mM NaCl 存在下で PolBI の DNA 合成活性は *PfuPCNA* により 7 倍に促進された。200 mM NaCl 存在下では、PolBI による DNA 合成はほとんど検出できなくなるが *PfuPCNA* により大きく回復することが観察され、*PfuPCNA* による促進効果は約 400 倍であった。PolD においても同様に NaCl による DNA 合成活性の阻害と、*PfuPCNA* による回復が観察された。

次に、古細菌の複製関連タンパク質が真核生物のものと構造的によく類似していることから、機能的に類似しているか否かについて調べた。*PfuPCNA* を仔牛胸腺由来 DNA ポリメラーゼ  $\delta$  (Pol $\delta$ ) に作用させて実験を行ったところ、Pol $\delta$  単独ではほとんど DNA 合成活性を示さず、human PCNA により活性は強く促進された。また *PfuPCNA* によっても明らかに活性の促進がみられた。コントロールとして用いた T4 DNA ポリメラーゼでは、human PCNA および *PfuPCNA* による活性の促進がみられなかった (Fig. 19)。さらに human RFC の ATP 加水分解活性についても DNA 存在下で、human PCNA および *PfuPCNA* によって促進が見られた (Fig. 20)。

#### 第四節 考察

本章では *P. furiosus* ゲノム DNA から、真核生物の PCNA、RFC とそれぞれ相同な配列を持つタンパク質に対応する遺伝子をクローニングし、それらが大腸菌内で発現させて産生されたタンパク質 (*PfuPCNA*, *PfuRFC*) を精製して *in vitro* における性質を調べた。

真核生物由来 RFC は一分子の大サブユニットと四種類の異なる小サブユニット一分子ずつから構成されるヘテロ五量体であり (20)、試験管内再構成の実験では *PfuRFC* は一分子の大サブユニットと四分子の小サブユニットから構成されると予想された。その他の古細菌由来の分子として *M. thermoautotrophicus* の PCNA、RFC の機能解析が報告されているが、この場合 RFCL と RFCS が 2 : 4 で複合体を形成すると報告している (23)。また *S. solfataricus* では RFCL と RFCS が 1 : 4 と報告されている (24)。さらに最近の論文では *Pyrococcus abyssi* の RFC は調製の方法によって 1 : 2 から 1 : 4 まで変ると述べられているが (25)、これらの報

告はいずれも試験管内再構成によるものであり、実験の精度にも問題があり、実際の古細菌細胞内タンパク質を分析しないと結論は出せない。古細菌種による RFC 複合体のサブユニット構成比については、さらなる検証が必要であると考えられる。

*Pfu*PCNA、*Pfu*RFC は *P. furiosus* 由来の DNA ポリメラーゼである PolBI、PolD の DNA 合成活性を促進した。*in vitro* において *Pfu*PCNA はローダーを必要とせずある程度は self-loading することができるが、*Pfu*RFC は *Pfu*PCNA による PolBI、PolD の DNA 合成活性の促進効果をさらに増大することから、細胞中では *Pfu*RFC が働いて効率のよいクランプローディングを行っているものと考えられる。これらの結果は 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。

*Pfu*RFC が ATP 加水分解活性を有し、それが DNA の存在下で *Pfu*PCNA により促進されることについては、真核生物の RFC でこれまでに知られていることとよく一致する(17)。RFC が DNA に結合することによってなんらかの構造変化をおこしていると思われされる。

真核生物由来 RFC が、PCNA による Pol $\delta$  の DNA 合成の促進を効率良く行うためには ATP を必要とするが(26,27)、*Pfu*RFC においては PolBI、PolD の *Pfu*PCNA による DNA 合成の促進を増大する効果には、ATP を必要としなかった。また反応に ATP を加えてもその効率に差がみられなかった(data not shown)。真核生物由来 RFC は ATP に比べて dATP、dCTP、dGTP を利用する効率をはるかに低いが、*Pfu*RFC は dATP を ATP と同程度に加水分解することから、本章で行った *in vitro* の反応では DNA 合成反応の基質として加えた dATP を用いて *Pfu*PCNA のローディングを行っていると考えられる。

*Pfu*RFC における ATP 加水分解活性とクランプローディング活性の関係についてはまだ不明な点が多く、真核生物の RFC とも共通する問題であり、さらに詳細な生化学的解析が必要であると考えられる。

高塩濃度における *in vitro* の DNA 合成反応では、PolBI および PolD の活性が著しく低下するものの、*Pfu*PCNA がより高い効率で PolBI、PolD による DNA 合成を促進した。この結果は、細胞内塩濃度が非常に高い *P. furiosus* の生理的な条件下で、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成が *Pfu*PCNA の補助によって実現してい

ることを示しており、真核生物の Pol $\delta$ が単独ではほとんど DNA 合成活性を示さず、PCNA、RFC の存在下でのみ効率良く DNA 合成を行うことと対応している。

最後に、*Pfu*PCNAがほ乳類のPol $\delta$ やRFCと機能的に相互作用したことは、複製研究における古細菌のモデル生物としての有用性を実際に支持するものであると考えられる。



## 第二章 クランプ (PCNA) とクランプローダー (RFC) の立体構造と機能

### 第一節 クランプ (PCNA) の立体構造

著者の構築した *Pfu*PCNA タンパク質の多量産生系を用いて調製された *Pfu*PCNA を用いて、結晶化とその構造決定が行なわれた結果(28)、全体的な立体構造は先に報告されていたヒト (29) や出芽酵母 (30) 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。大腸菌のクランプである PolIII  $\beta$  サブユニットは二量体でリングを形成している (31)。この構造と三量体でリングを形成している PCNA の構造を比較すると、どちらもリング内部に位置する二本の $\alpha$ ヘリックスと、その外側に位置する逆平行 $\beta$ シートからなるドメイン構造がみられ、このユニットが六個集まりリングが形成されていることがわかった (Fig. 21)。このリングは中央部に約 35 Å の穴をもっており二本鎖 DNA の直径は 20 Å であるため、立体障害なしに DNA と相互作用することができる。

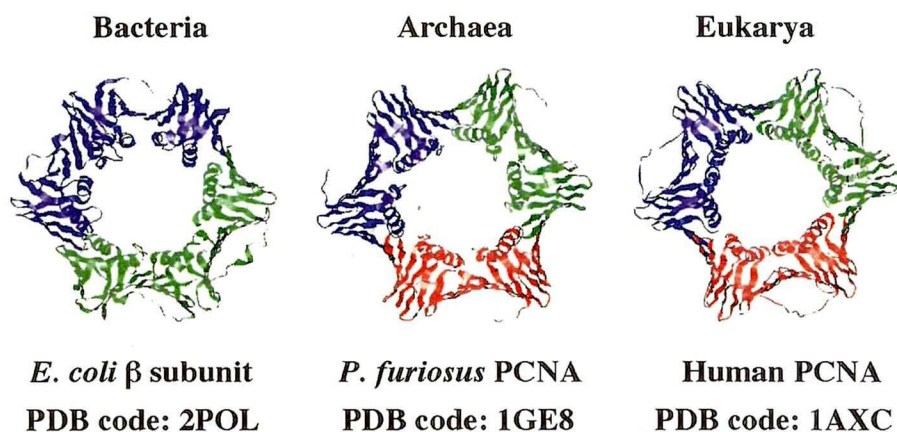


Fig. 21. Comparison of the clamps from the three domains of life.

*Pfu*PCNA では、三量体構造の保持に最も重要な役割を果たす分子間の逆平行 $\beta$ シートにおける水素結合(N-O distance < 3.3 Å)の数が四組であり、真核生物 PCNA の場合 (ヒト PCNA の場合が八組、酵母 PCNA の場合が七組) に比べてほぼ半減していた (Fig. 22)。この事実から、*Pfu*PCNA は真核生物の PCNA と比べて分子間相互作用が弱いことに加えて、合成反応を高温 (70 °C) で行なうことから、PCNA 三量体の開環が起こりやすく、*in vitro* における *Pfu*PCNA 単独の self-loading 現

象が観察されたと考えられる。

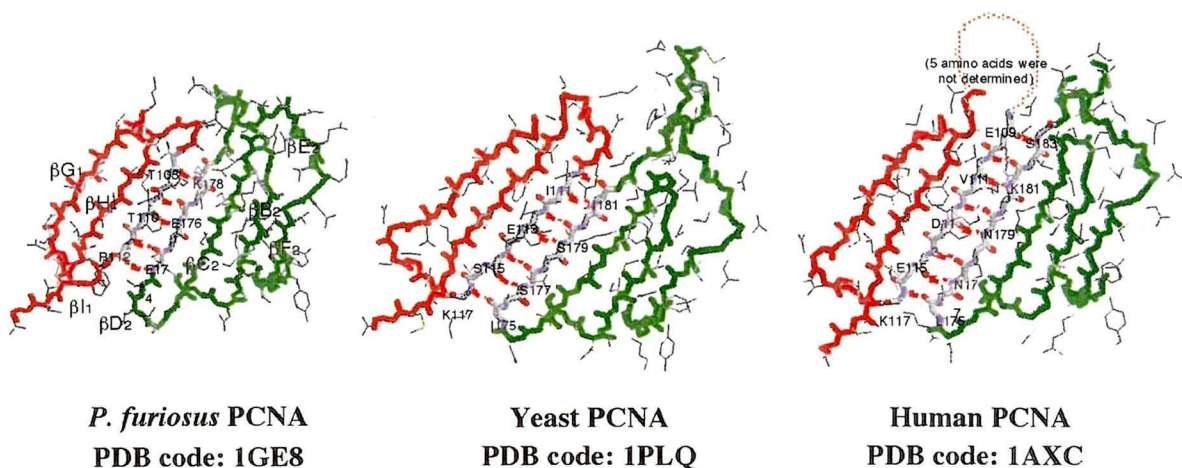


Fig. 22. Comparison of main-chain hydrogen bonds at the intermolecular interface.

## 第二節 クランプローダー (RFC) の立体構造

クランプローダーの構造と機能の関係を明らかにするために、まず *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、重原子同型置換法により分解能 2.8 Å で構造を決定した ( $R=0.224, R_{\text{free}}=0.277$ ) (7)。

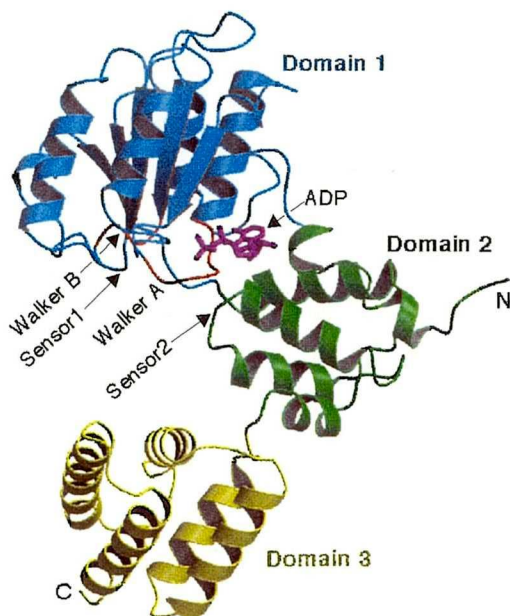
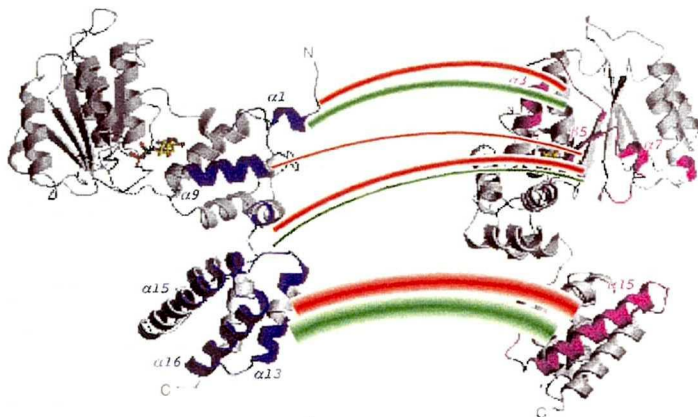
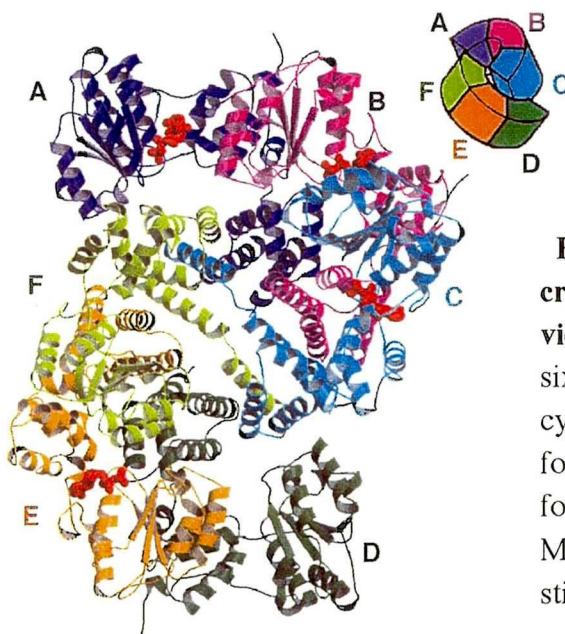


Fig. 23. The overall fold of an RFCS subunit shown by a ribbon representation. The  $\alpha$  helices and  $\beta$  strands are drawn by coils and arrows, respectively. The chain is colored cyan for Domain 1, green for Domain 2, and yellow for Domain 3. Walker A and B motifs are colored red. ADP is shown as a purple stick model.

RFCS サブユニットは三個のドメインからなる三日月型の分子骨格を有していた (Fig. 23)。Walker A モチーフと Walker B モチーフは N-末端側のドメイン 1 (20-168 位) にあり、これらのモチーフを含むヌクレオチド結合クレフトがドメイン 1 とドメイン 2 (2-19 位と 169-231 位) の間に形成されていた。ドメイン 1 とドメイン 2 は隣り合ったサブユニットの N-末端領域と相互作用していたが、その詳細な相互作用形式は多様であり、N-末端側の領域はコンフォメーションを変化させやすいことが推定された。一方、C-末端側の約 100 アミノ酸残基は  $\alpha$ ヘリックスのみからなり、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 (Fig. 24)。



**Fig. 24. Interaction mode of RFCS subunits, represented by an open-book view.** Direct interactions observed in more than 2 out of the 4 subunit-subunit interfaces in the hexameric crystal are shown. The red and green lines indicate hydrogen bonds and hydrophobic interactions, respectively.

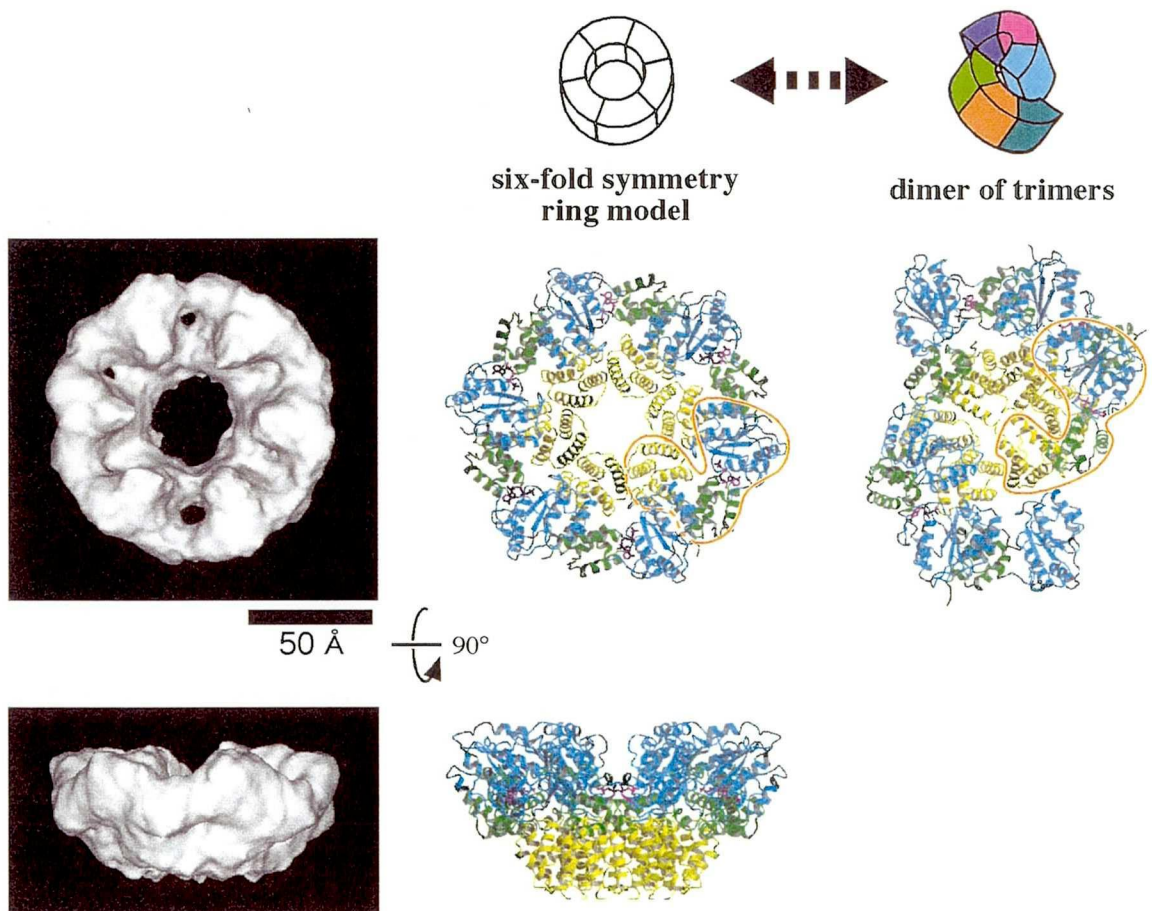


**Fig. 25. The RFCS hexamer in the crystal shown as a ribbon diagram viewed from the N-terminal side.** The six subunits are colored blue, magenta, cyan, green, orange, and yellow-green, for MolA to MolF, respectively. The four ADP molecules bound to MolA, MolB, MolC, and MolE are shown as red stick models.

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 (dimer-of-trimers) をとっていた。(Fig. 25)。六個の RFCS サブユニットのうち四個において、ヌクレオチド結合クレフトに ADP 分子が結合していた。

### 第三節 考察

*Pfu*PCNA はヒト PCNA によく類似した三量体リング構造を形成しており、全体的なリング構造は、大腸菌 PolIII  $\beta$ サブユニットの構造とも類似していることから、クランプ分子としての基本的な三次元構造は、三つの生物界で保存されていること



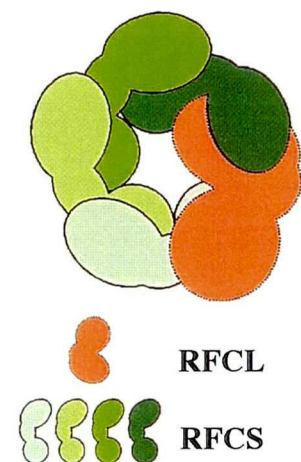
**Fig. 26. Comparison of a hypothetical hexameric ring of RFCS (center) with the electron microscopic image (left) (32). The 6-fold symmetry ring model was built from a semicircular trimer of RFCS in the crystal (right) and is drawn in top (upper) and side views (lower). one subunit in each hexamer encircled.**

が示された。またサブユニット間の水素結合の状態から、真核生物由来の PCNA ではなく、*Pfu*PCNA に見られる self-loading 現象を説明することができた。

RFCS では、結晶構造解析と並行して電子顕微鏡を用いた単粒子解析法による構造解析も行われ、六回回転対称を有するリング構造の存在が観察された (32)。リングの外径は約 120 Å、内径は約 30 Å、高さは約 55 Å であった。結晶構造中の半円形の三量体は疑似の六回回転対称軸を有していたので、Fig. 26 に示すとおり、結晶構造を元にリングモデルを構築することができた。構築した六回回転対称リングモデルは電子顕微鏡によって観察された RFCS 粒子と非常によく似た大きさと形を示した。現在リング構造あるいは結晶の dimer-of-trimers のどの部分が、RFCL を含む完全な RFC 複合体中での四つの RFCS 構造に一致しているかははっきりしていないが、少なくとも半円形三量体構造は RFCS のサブユニット間の機能的な結合を反映するものと予想され、真核生物由来の RFC のサブユニット間相互作用様式を理解するための貴重な情報を提供するものと考えている。

クランプローダーの立体構造解析に関しては、最近大腸菌において  $\gamma$  複合体全体の結晶構造が決定された(33)。 $\gamma$  複合体は  $\delta$  サブユニット一個、 $\gamma$  サブユニット三個、および  $\delta'$  サブユニット一個からなるヘテロ五量体を形成していた。ATPase 活性をもつ  $\gamma$  サブユニットには RFC ボックスの配列が含まれているが、 $\delta$  や  $\delta'$  にはその配列が存在せず、真核生物の RFC サブユニットとのアミノ酸配列の相同性も低い。しかしながら  $\delta$ 、 $\gamma$ 、および  $\delta'$  サブユニットは互いによく似た三個のドメインからなる三日月型の分子骨格を有していた。五つのサブユニットの N-末端および C-末端ドメインは複合体の同じ側に位置し、C-末端ドメインは閉じたリングを形成し、互いに密な接触をしていた。N-末端ドメインは  $\delta$  と  $\delta'$  の間にスペースがあり、開いたリングになっていた。

*P. furiosus* 由来 RFCS 六量体の結晶構造中で観測された構造的特徴、すなわちサブユニット構造およびサブユニット間相互作用様式は、大腸菌  $\gamma$  複合体で観測されたものとよく似ていた。したがって



**Fig. 27 Model of RFCL-RFCS complex.**

RFCL と RFCS からなる機能的に完全な古細菌 RFC 複合体、そしておそらくは真核生物の複合体も、大腸菌 $\gamma$ 複合体によく似た構造を持っていると想像される。

以上のことから、RFCL-RFCS 複合体を予想した模式図を Fig. 27 に示す。すなわち RFCL 一分子と RFCS 四分子が N-末端ドメインを同じ方向に向けて C-末端ドメイン間で強い相互作用をしながら、リング構造を形成しているのではないかと予想している。

### 第三章 DNA 複製因子における分子間相互作用の解析

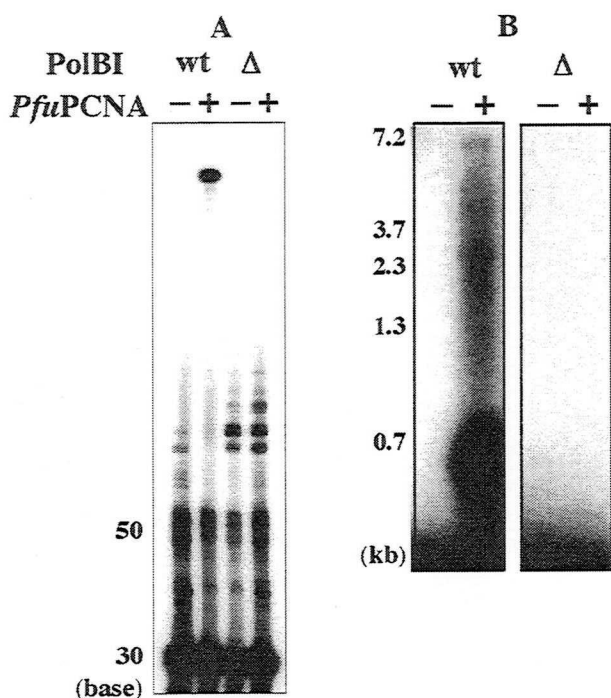
#### 第一節 PCNA 結合タンパク質と PCNA の相互作用の解析

これまでの真核生物における研究から PCNA は RFC、DNA ポリメラーゼといった DNA の複製関連タンパク質以外にも、DNA 修復、細胞周期の制御等にかかわるタンパク質と相互作用することが知られている。多くの PCNA 結合タンパク質には共通性の高いアミノ酸配列、Qxx(L/I/M)xxF(F/Y) (x 位は不特定のアミノ酸)、が見つかっており PIP (PCNA Interacting Protein) ボックスと呼ばれている(34, 35)。いくつかのタンパク質について、実際に PIP ボックス部位によって PCNA と結合することが結晶構造解析や変異体の解析によって明らかにされている(29, 34, 36)。*P. furiosus* 由来のタンパク質では、DNA ポリメラーゼ I (PolBI)、DNA ポリメラーゼ II (PolD) の大サブユニット(DP2)、RFC の大サブユニット(RFCL)、フラップエンドヌクレアーゼ(Fen1)、ホリディジャンクションリゾルベース(Hjc)のいずれも C-末端に、それぞれ PIP ボックス様の配列が存在している(Table 2)。この PIP ボックス部位が実際に PCNA との相互作用に関係するか否か、PolBI と RFCL について調べた。

**Table 2. Eukaryotic and archaeal proteins containing the conserved PCNA-binding motif.**

protein	function	sequence	size
human p21	cell cycle regulation	143 RQTSMTDFYHSKRRLIF	159 164
human Fen1	flap endonuclease	336 TQGRLLDDFFKVTGSLSS	352 380
<i>S. pombe</i> Cdc27	DNA polymerase $\delta$ subunit	360 QQKSIMSFFGKK	371 371
human DNA ligase I	replication-specific DNA ligase	1 MQRSIMSFFHPKKEGKA	17 919
human RFC140	clamp loader large subunit	1 MDIRKFFGVIPSGKK	15 1148
human MSH3	mismatch repair	20 RQAVLSRFFQSTGSLKS	36 1128
human MSH6	mismatch repair	3 RQSTLYSFFPKSPALSD	19 1360
murine XPG	excision repair endonuclease	988 TQLRIDSFFRLAQEQKQ	1004 1170
human MCMT	5' cytosine methyltransferase	163 RQTTITSHFAGPAKRR	179 1616
human UNG2	uracil DNA glycosylase	3 GQKTLYSFFSPSPARKR	19 313
human WRN	helicase	73 DQWKLLRDFDIKLNKVF	89 1362
<i>P. furiosus</i> Pol BI	DNA polymerase	762 RQVGLTSWLNIRKS	775 775
<i>P. furiosus</i> Pol D (DP2)	DNA polymerase large subunit	1252 KVISLDDFFSKR	1263 1263
<i>P. furiosus</i> RFCL	clamp loader large subunit	469 KQATLFDLFLKK	479 479
<i>P. furiosus</i> Fen1	flap endonuclease	330 KQSTLESWFKR	340 340
<i>P. furiosus</i> Hjc	holiday junction resolvase	115 IQRTLEGKS	123 123
consensus		QxxhxxFa	

h = moderately hydrophobic residues (e.g. L, I, M); a = highly hydrophobic / aromatic residues (e.g. F, Y); x = any residue.



**Fig. 28. Effect of the PIP box of Pol B on *PfuPCNA*-dependent DNA synthesis.** The *PfuPCNA*-dependent primer extension reactions were compared using wild-type Pol BI and Pol BIA.

The reaction products were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (A), alkali agarose gel electrophoresis (B) followed by autoradiography.

ブユニットには見つからなかった (Table 3)。そこで RFCL の PIP ボックス部位が *PfuPCNA* との相互作用に重要な役割を果たす可能性を調べるために、PolBI の *PfuPCNA* 依存的な DNA 合成活性が *PfuRFC* によって促進されることを指標にして調べた。C-末端 12 残基 (468-479 位) を欠失させた

まず PolBI の場合、PolBI の C-末端から PIP ボックスを含む 30 残基 (746-775 位) を欠失させた変異体 PolBIA を作製し調べた。その結果この変異体は基本的な DNA ポリメラーゼ活性を保持していたが、DNA 鎖伸長活性において *PfuPCNA* による促進効果が見られなくなった (Fig. 28)。このことから、PolBI の C-末端の 30 残基が *PfuPCNA* との相互作用に必須であり、おそらくこの中に含まれる PIP ボックスが実際に PCNA と相互作用しているものと予想される。

次に RFC について調べた。古細菌由来 RFC タンパク質のうち大サブユニットには C-末端に PIP ボックス様の配列が見つかったが、小サ

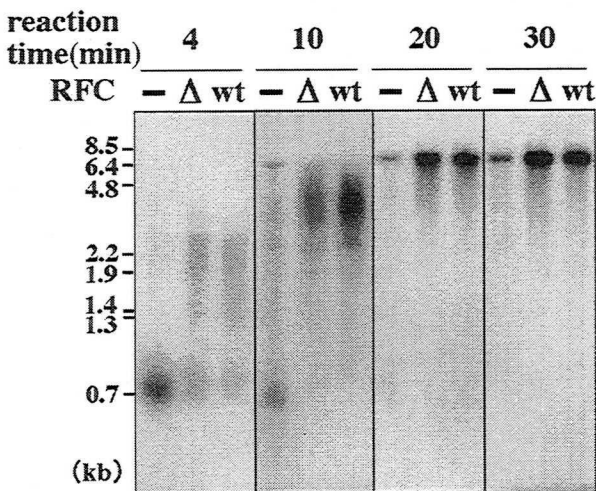
**Table 3. PCNA-binding motif in archaeal RFCL**

organism	PIP sequence
<i>P. furiosus</i>	PKKGKQATLFDLKK
<i>M. jannaschii</i>	EDKGKQLTLDAFFK
<i>M. thermoautotrophicus</i>	KPKEKQTSLFOFS
<i>A. fulgidus</i>	KKAGKNLTLDSFFS
<b>consensus</b>	<b>QxxhxxFa</b>

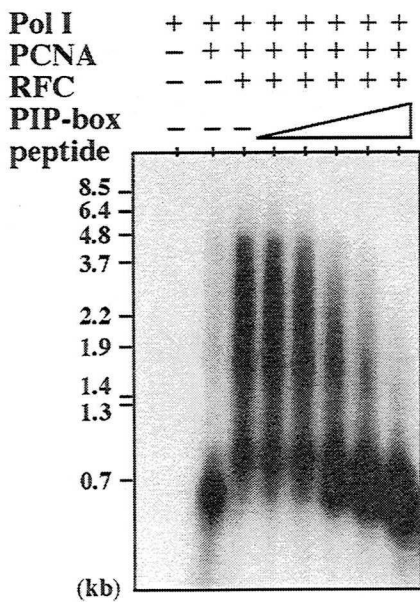
h and a represent moderately hydrophobic residues (L, I, M) and highly hydrophobic residues with aromatic side chains (F, Y), respectively. x indicates any residues.



変異体 RFCL $\Delta$ を作製し、これを野生型の RFCS と混合して *PfuRFC* 複合体としてプライマー伸長反応に用いた。様々な反応時間における DNA 合成産物を野生型の RFCL-RFCS 複合体を用いた場合と比較した。その結果予想外に、PolBI の *PfuPCNA* 依存性の DNA 合成活性を促進する働きは、RFCL $\Delta$ を含む *PfuRFC* と野生型の *PfuRFC* の間に差が見られなかった(Fig. 29)。この結果は *PfuRFC*-*PfuPCNA* 間の機能的な相互作用のためには RFCL の C-末端 12 残基は必須ではなく、それ以外の部分が重要な働きを担うことを示しているが、同時に、この PIP ボックス様の配列



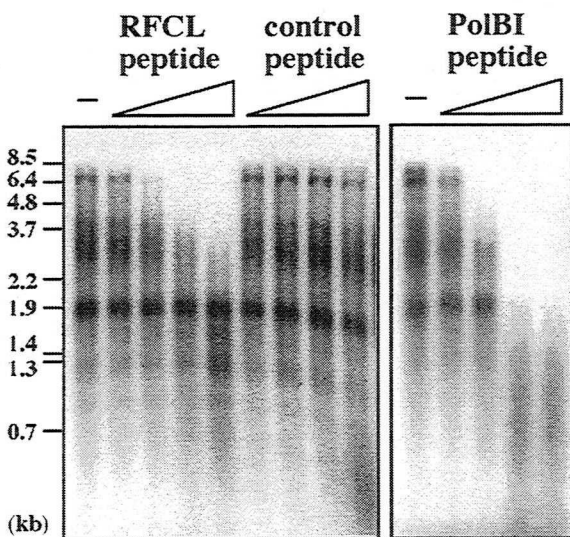
**Figure 29. Effect of the PIP box of RFCL on the *in vitro* *PfuPCNA*-dependent DNA synthesis.** The *PfuRFC* and *PfuPCNA*-dependent primer extension reaction of Pol BI were compared using wild-type *PfuRFC* and *PfuRFC* $\Delta$ 12. Aliquots at each indicated time were analyzed by alkaline agarose gel electrophoresis. Lanes -,  $\Delta$ , and wt indicate no *PfuRFC*, *PfuRFC* $\Delta$ 12, and *PfuRFC*, respectively, in the reactions.



**Fig. 30. Inhibition of the *PfuPCNA*-dependent DNA synthesis activity of Pol BI by the PIP-box peptide.** The PIP-box peptide was added in increasing amounts (20, 50, 200, 500, and 1000 pmol) to the primer extension reaction containing 1 pmol of  $^{32}$ P-labeled primer, 0.2  $\mu$ g of M13 mp18ssDNA, 0.5 u of Pol BI, 2 pmol of *PfuPCNA* (trimer), and 2 pmol of *PfuRFC*, and the reaction mixtures were incubated at 70 °C for 4 min. The reaction products were analyzed by alkaline agarose gel electrophoresis followed by autoradiography. Size markers were prepared by labeling *Bst*PI-digested  $\lambda$ DNA with  $^{32}$ P-ATP.

の機能について、さらに興味を持たれた。

そこで RFCL の PIP ボックス配列を含むペプチド (C-末端の 469-479 位の 11 残基 KQATLFDFDLKK、PIP ボックスのうち特に保存度の高い残基に下線を付した) を合成して、それを PolBI の DNA 合成反応に加えて直接の影響を調べた。はじめに *Pfu*PCNA および *Pfu*RFC の両者が存在する条件で、PolBI による DNA 鎖伸長反応にこのペプチドを加えて調べたところ、濃度依存的に DNA 鎖伸長反応を阻害した(Fig. 30)。このことは RFCL の PIP ボックスペプチドが *Pfu*PCNA 分子上の機能的な相互作用部位に結合して、*Pfu*RFC-*Pfu*PCNA 間の結合、または PolBI-*Pfu*PCNA 間の結合のいずれかを阻害したためと考えられた。そこで、次に *Pfu*RFC を除いた反応で *Pfu*PCNA 依存的な PolBI の DNA 鎖伸長反応を調べると、このペ

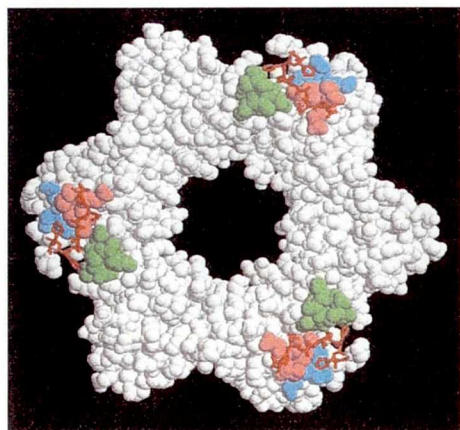


**Fig. 31. Inhibition of the *Pfu*PCNA-dependent DNA synthesis activity of Pol BI by the PIP-box peptides derived from RFCL and Pol BI.** The each PIP-box peptide was added in increasing amounts (50, 500, 2500, and 5000 pmol) to the primer extension reaction containing 1 pmol of <sup>32</sup>P-labeled primer, 0.2 μg of M13 mp18ssDNA, 0.5 u of Pol BI, 2 pmol of *Pfu*PCNA (trimer), and the reaction mixtures were incubated at 70 °C for 4 min. The reaction products were analyzed by alkaline agarose gel electrophoresis followed by autoradiography. As a negative control, the control peptide (Arg-Arg-Leu-Ile-Glu-Asp-Ala-Glu-Tyr-Ala-Ala-Arg-Gly) was added.

プチドはやはり濃度依存的に DNA 鎖伸長反応を阻害した(Fig. 31)。このことは RFCL の PIP ボックスペプチドが *Pfu*PCNA 上の機能的な相互作用部位に結合して、PolBI-*Pfu*PCNA 間の結合を阻害したためと考えられた。PolBI 由来の PIP ボックスを含むペプチド (PolBI C-末端の 760-775 残基 KTRQVGLTSWLNIKKS) を用いた場合にも、*Pfu*PCNA 依存的な PolBI の DNA 鎖伸長反応が阻害された。PIP ボックスと全く異なる配列の 12 残基のペプチドを用いた場合にはこのような反応阻害は

生じなかった。なおこの反応では *Pfu*PCNA の効果を観察しやすいように、Fig. 30 の実験とは異なり、プライマーの結合部位を変えて DNA 鎖伸長反応を行った。その結果、鋳型の二次構造による DNA 鎖伸長阻害は 1.9 kbase 付近に観察された。

このように PIP ボックスペプチドと *Pfu*PCNA が機能的な相互作用をすることがわかったので、RFCL の PIP ボックス配列を含むペプチド（C-末端の 469-479 位の 11 残基）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分子置換法により構造を解析した ( $R=0.235, R_{\text{free}}=0.291$ )。 *Pfu*PCNA は、溶液中及び単体の結晶中ではリング構造の三量体として存在するが、

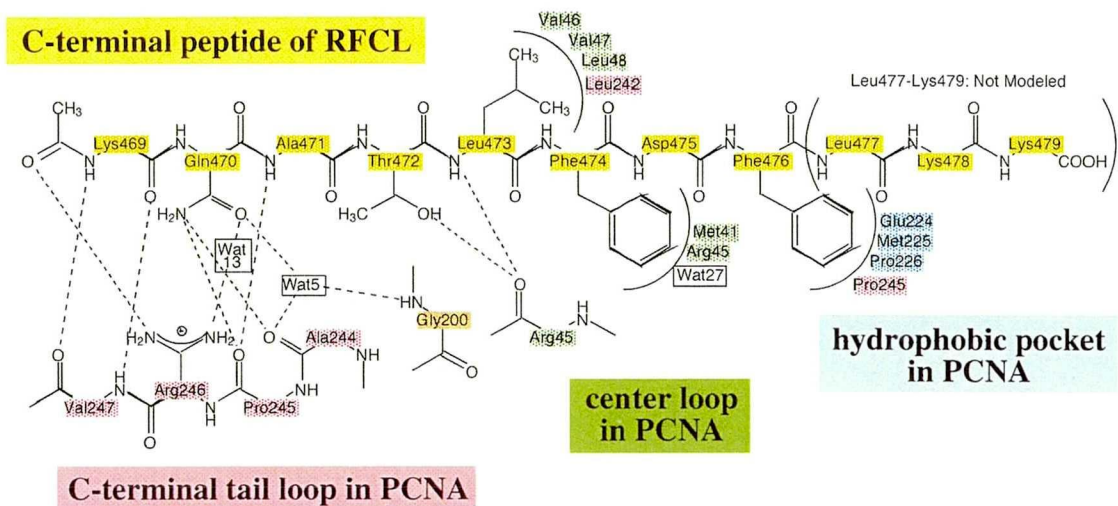


**Fig. 32. Overall structure of the trimer of the *Pfu*PCNA/RFCL C-terminal peptide complex.**

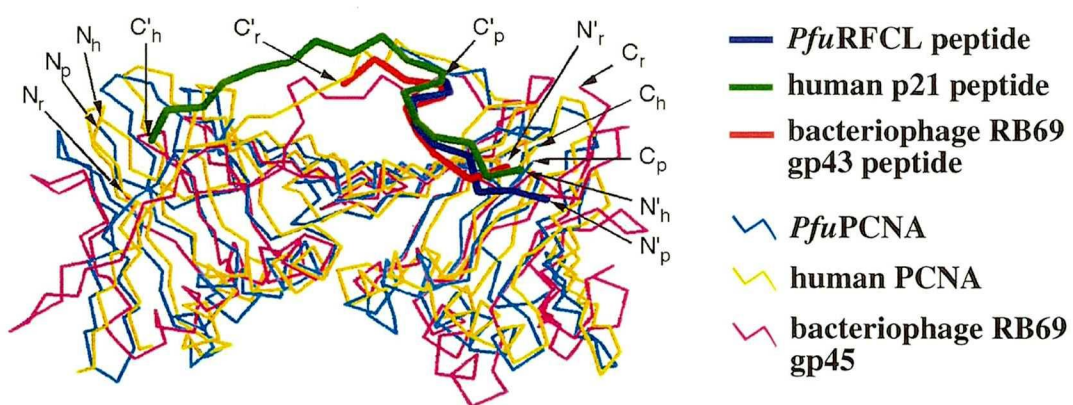
The three peptide molecules bound to *Pfu*PCNA are shown as red stick models. The interacting residues in *Pfu*PCNA are shown in pink for C-terminal tail, green for center loop, blue for hydrophobic pocket,

RFCL ペプチドとの複合体の結晶中においてもリング三量体構造は維持されていた。RFCL ペプチドは、*Pfu*PCNA 一分子につき一分子結合していた(Fig. 32)。結合に関与しているそれぞれの部位をみると、RFCL ペプチドの N-末端の三残基(Lys469-Ala471)が *Pfu*PCNA の C-末端ループ(Ala244-Val247)と水素結合を形成し、続いて RFCL ペプチドの短いヘリックス(Leu473-Asp475)が *Pfu*PCNA の疎水ポケット(Met41,Arg45-Leu48,Leu242)に位置し、RFCL ペプチドの Phe476 が *Pfu*PCNA の Glu224-Pro226 と Pro245 に囲まれていた(Fig. 33)。RFCL ペプチドの C-末端三残基(Leu477-Lys479)については、得られた電子密度マップからは位置決定ができなかった。

ヒト p21<sup>CIP1/WAF1</sup> の PIP ボックスを含むペプチドがヒト PCNA と結合した状態の構造(29)、およびバクテリオファージ RB69 の DNA ポリメラーゼ (gp43) の PIP



**Fig. 33. Schematic representation of the intermolecular interactions observed in the *Pfu*PCNA/RFCL C-terminal peptide complex.** The residues corresponding to the C-terminal region of RFCL (469-479) are indicated in yellow. The interacting residues in *Pfu*PCNA are shown in pink for C-terminal tail, green for center loop, blue for hydrophobic pocket, and orange for not previously classified.

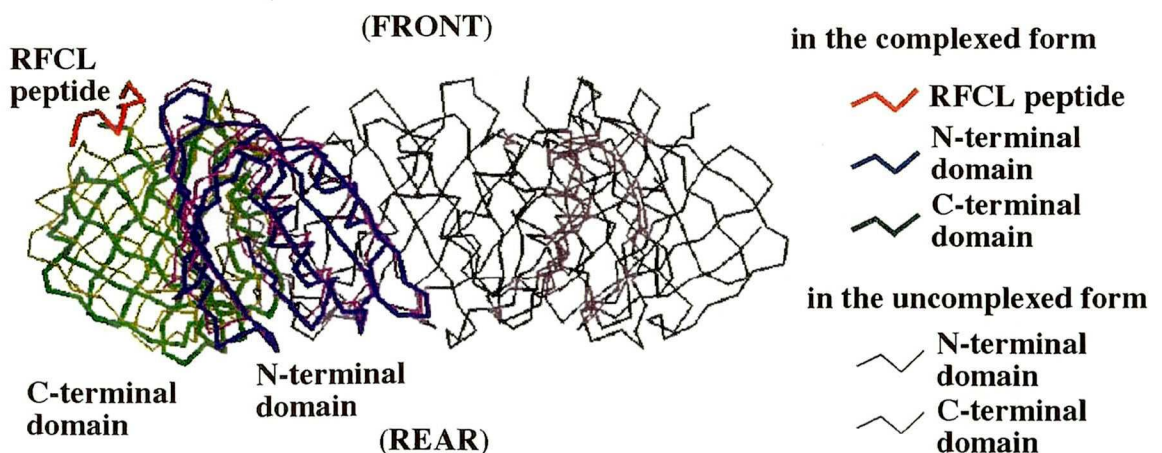


**Fig. 34. Comparison of the three-dimensional structures of PCNA-PIP-box peptide complexes.** The N- and C- termini are marked by the letters N and C (for the clamps) or N'- and C'- (for peptides) with subscripts indicating the species (p for *P. furiosus*, h for human and r for RB69).

ボックスを含むペプチドがファージ gp45 と結合した状態の構造(37)を、RFCL ペプチド-*Pfu*PCNA 複合体の構造と比較した。三組の PIP ボックスペプチド-クランプ複合体の構造を重ねると、その結合様式が互いによく類似しており、PIP ボックスを介した分子間相互作用は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 (Fig. 34)。

次に *Pfu*PCNA と RFCL ペプチド-*Pfu*PCNA 複合体の三次構造を重ね合わせて比較すると、RFCL ペプチド-*Pfu*PCNA 複合体では *Pfu*PCNA 分子の C-末端側ドメインが RFCL ペプチドに押し下げられる形の構造変化を起こしていることがわかった (Fig.35)。この結果三量体構造の保持に重要な役割を果たす分子間の逆並行βシートにおける水素結合 (N-O distance < 3.3 Å) の数が四組から七組になり、酵母の PCNA の七組、およびヒト PCNA の八組に匹敵する値まで増加することが判明した。また、*Pfu*PCNA のみに見られ、分子間水素結合の不足を補って三量体構造の維持に貢献していると予想される、*Pfu*PCNA リング構造の内側の分子間イオン対ネットワークについては、RFCL ペプチドとの複合体形成による構造変化に伴い結合の組換えが観察された。これらの知見は、PIP ボックスが結合することで *Pfu*PCNA のリング構造が安定化することを示唆している。

そこで、RFCL ペプチドの結合にともなって PCNA のリング構造が安定化するこ

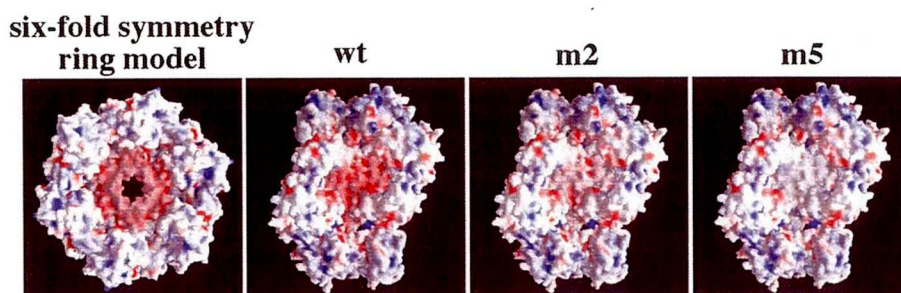


**Fig.35. Structural comparison between complexed (bold lines) and uncomplexed (thin lines) *Pfu*PCNA molecules in the trimeric state.** For clarity, only one PCNA-peptide complex is shown.

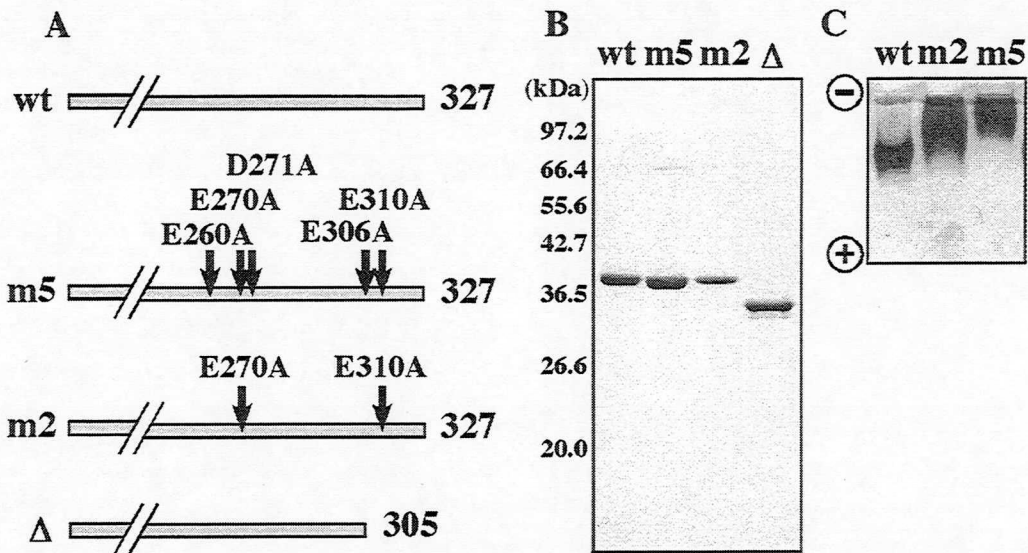
とを実験的にとらえるため、化学的クロスリンク法による三量体の形成およびゲルろ過クロマトグラフィーによる分析を行った(data not shown)。しかし、これらの方法ではペプチドの有無による三量体形成効率の差は観察されず、リング構造の安定性について比較することはできなかった。

## 第二節 RFCS 変異体の機能解析

*PfuRFC* と *PfuPCNA* との相互作用をさらに詳しく解析するために、第二章第二節で示した RFCS 複合体の結晶構造解析より得られた情報に基づいて変異体を作製し、それらの生化学的解析を行った。まず前節で *PfuRFC* と *PfuPCNA* の相互作用には RFCL の PIP ボックス以外の関与が示されたこと、および RFCS だけでも、弱いながら *PfuPCNA* 依存的な DNA 伸長活性を促進することができることから、RFCS 由来の分子間相互作用について考察を行った。RFCS 複合体の結晶構造から計算された分子表面の静電ポテンシャル分布を見ると(37)、中心部分に負に荷電した領域が見られ、この荷電は RFCS の再構築した 6 回回転対称モデルでも中心に集中しており、その役割に興味をもたれた(Fig. 36)。その負の荷電の原因になっている酸性アミノ酸 (Glu260, Glu270, Asp271, Glu306, Glu310) をすべて Ala に変換した RFCS 変異体 RFCSm5 と、比較のため、Glu270, Glu310 の二残基だけを変換した変異体 RFCSm2 を作製した。また、隣り合う分子の相互作用による RFCS 複合体形成において C-末端の $\alpha$ ヘリックスが重要と考えられたため、C-末端 22 残基(306-327 位)を欠失させた変異体 RFCS $\Delta$ も作製した(Fig. 37A)。



**Fig. 36. Electrostatic potential on the surface of the RFCS hexamer, calculated by using the program GRASP with NaCl at 0.15 M. Positively charged surfaces and negatively charged surfaces are colored blue and red, respectively.**

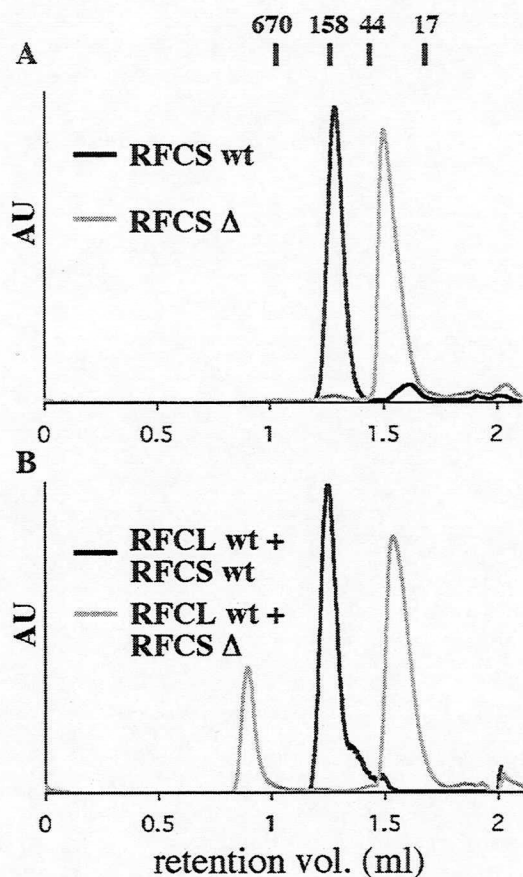


**Fig. 37. Series of the mutant RFCS proteins.** A. The sites of the mutations are shown. B, C. Purification of the mutant RFCS proteins. Wild type and mutant RFCS proteins (each 1  $\mu\text{g}$ ) were separated by electrophoresis on a 12 % acrylamide gel containing SDS with Tris-glycine buffer in panel B or a 6% acrylamide gel with Tris-acetate buffer (pH8.0) under native conditions in panel C. After separation, the proteins were visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue in panel B and silver in panel C.

これらの RFCS 変異体は野生型 RFCS と同様の方法で精製し、高純度のタンパク質標品を得た(Fig. 37B)。部位特異的変異体について、複合体分子表面の静電ポテンシャル分布をモデル上で計算すると、中心の負の荷電が減少していた。実際にネイティブ条件における電気泳動でも、荷電の差に対応して移動度の差が見られた(Fig. 37C)。

ゲルろ過クロマトグラフィーで、RFCSm5 および RFCSm2 の変異体は野生型の RFCS と同様に分子量 150,000 の画分に溶出され、重合体を形成することがわかったが、RFCS $\Delta$ はモノマーに相当する分子量 35,000 の画分に溶出されて重合体を形成できないことがわかった(Fig. 38A)。

次に野生型および変異体 RFCS を野生型の RFCL とそれぞれ混合してゲルろ過クロマトグラフィーをおこない、複合体形成能をしらべたところ、予想通り RFCS $\Delta$ は RFCL との複合体も形成できないことがわかった(Fig. 38B)。RFCSm5 および RFCSm2 の変異体は野生型と同様に複合体を形成し分子量約 200,000 の画分に溶出



**Fig. 38. Investigation of the RFCS complex by gel filtration analysis.**

A. The wild type and mutant RFCS proteins were fractionated on a gel filtration column. Elution of the proteins was monitored by the absorbance at 280 nm.

B. The wild type and mutant RFCS proteins were mixed with the RFCL proteins, and the RFC complexes were fractionated on the same column as in A.

された(data not shown).

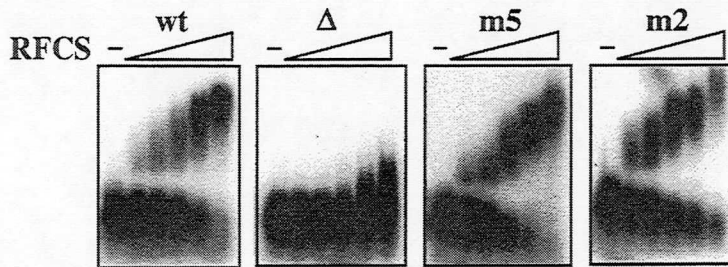
RFCS の DNA 結合活性をゲルシフトアッセイにより調べたところ、RFCSm5 および RFCSm2 の変異体は野生型の RFCS と同様に濃度依存的にバンドシフトが見られ、DNA 結合活性に差が見られなかったが、RFCS $\Delta$ の DNA 結合活性は観察されなかった。これら RFCS の DNA 結合活性には ATP による影響はみられなかった(Fig. 39)。

次にこれらの RFCS 変異体を野生型の RFCL とそれぞれ混合して *Pfu*RFC 複合体 (RFCL+RFCS) を作製し、*Pfu*PCNA 依存的な PolBI の DNA 合成活性を促進する効果を調べた。RFCS $\Delta$ と RFCL の混合物では予想通り DNA 鎖伸長反応の促進効果が全く見られなかった。また RFCSm5 および RFCSm2 を含む *Pfu*RFC 複合体を用いた場合は野生型の *Pfu*RFC 複合体に比べて DNA 伸長促進効果がそれぞれ 41%、84%

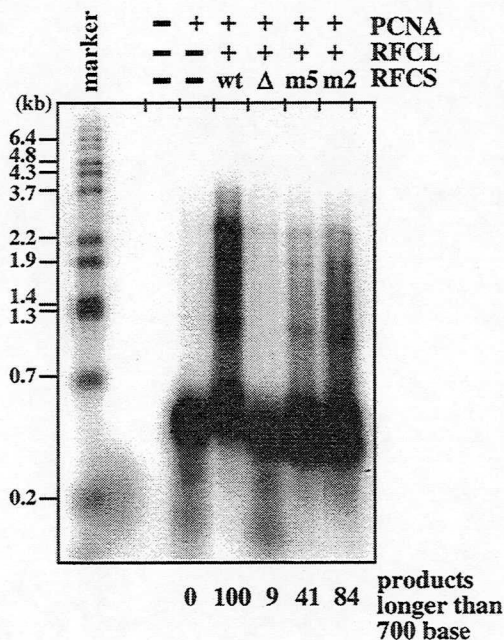
に低下していた(Fig. 40)。以上のことから、*Pfu*RFC 複合体においてもその中央に局在すると予想される負の荷電は、*Pfu*PCNA との直接的な相互作用にとって重要であり、*Pfu*PCNA 分子上の正に荷電した部分との相互作用に貢献していることが示唆された。

そこで、次に RFCS と *Pfu*PCNA の直接的な相互作用を調べるため免疫沈降実験を行った。野生型および変異体の RFCS と *Pfu*PCNA を混合し、RFCS 抗体に結合

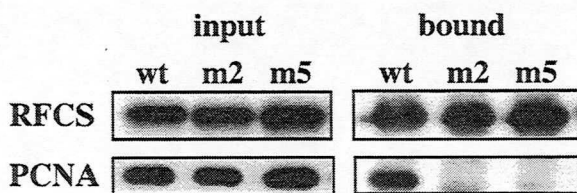




**Fig. 39. DNA binding activities of mutant RFCS.** Various concentrations (0.15, 0.3, 0.6, 1.2 and 2.4  $\mu$ M) of proteins were incubated with 50 nM of  $^{32}$ P-labeled DNA (d49 mer) at 60  $^{\circ}$ C for 5 min. The reaction products were analyzed by 1 % agarose gel electrophoresis followed by autoradiography. The left lane in each panel shows the reaction without protein.

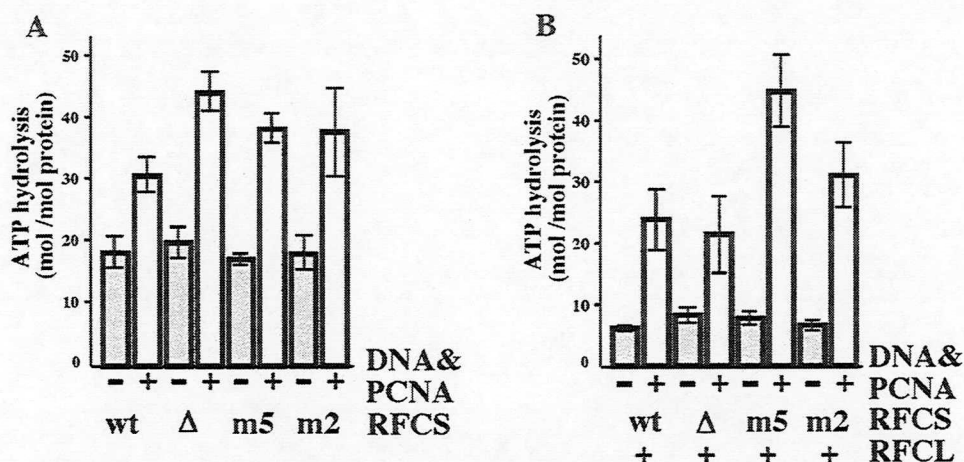


**Fig. 40. Effects of the mutations in RFCS on the *Pfu*PCNA-dependent DNA synthesis of *P. furiosus* Pol BI.** The reaction mixtures with the indicated proteins in each lane were analyzed by 1 % alkaline agarose gel electrophoresis, and the products were visualized by autoradiography. The sizes indicated on the left were from *Bst*I-digested  $\lambda$  phage DNA labeled by  $^{32}$ P at each 5' end. Amounts of DNA products longer than 700 bases by each RFCS are shown as the % relative to the product by *Pfu*RFCS containing the wild type RFCS.



**Fig. 41. Immunoprecipitation of the purified *Pfu*PCNA and RFCS proteins by the anti-RFCS antibody in vitro.**

*Pfu*PCNA and the wild type or mutant RFCS proteins were mixed and immunoprecipitated by the anti-RFCS anti-serum. The precipitates were analyzed by Western blotting using each specific antibody indicated on the left side.



**Fig. 42. ATPase activity of RFCS and the RFCS-RFCL complex.**

A. The RFCS protein (at 0.8  $\mu\text{M}$  as a monomer), [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP(0.1 mCi/ml), and 0.1 mM of ATP were incubated with or without DNA and *Pfu*PCNA at 65 °C for 30 min, and aliquots of the reactions were analyzed by thin layer chromatography. B. The RFCS and RFCL proteins (at 0.8  $\mu\text{M}$  and 0.2  $\mu\text{M}$ , respectively), [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP(0.1 mCi/ml), and 0.1 mM of ATP were incubated with or without DNA and *Pfu*PCNA at 65 °C for 10 min and the reactions were analyzed as described above. The graphs show the values after subtraction of the background (radioactivities from the reaction without protein at each time point).

する画分についてウェスタンブロット法により分析をおこなった。野生型 RFCS と混合したとき *Pfu*PCNA は抗 RFCS 抗体結合画分に検出されたが、RFCSm5 および RFCSm2 と混合したときには、*Pfu*PCNA は検出できなかった(Fig. 41)。このことから *Pfu*PCNA と RFCS 分子の間の直接的な相互作用が RFCS の負の荷電の減少によって低下したことがわかった。なお抗 *Pfu*PCNA 抗体に結合する画分についてウェスタンブロット法による分析をおこなったところ、RFCS が非特異的に proteinA-Sepharose に結合したために、RFCS と *Pfu*PCNA の間の特異的相互作用の分析ができなかった。

前述のように、RFCS および *Pfu*RFCS は ATP 加水分解活性を有し、その活性は DNA と *Pfu*PCNA により促進される。野生型および変異体の RFCS について、RFCS 単独の場合と野生型の RFCL と混合した場合の ATP 加水分解活性を調べた。Fig. 42A に示すように RFCS 変異体の ATP 加水分解活性は DNA と *Pfu*PCNA の存在、非存

在によらず野生型 RFCS とほぼ同程度であった。また野生型の RFCL と混合した場合もすべての RFCS は同程度の ATP 加水分解活性を示した(Fig. 42B)。これらの結果は、少なくとも ATP 加水分解反応に関する限りは、変異体 RFCS タンパク質は正常な構造を維持していることを示している。

以上の結果から、おそらく 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。このことは RFC-PCNA の直接的な結合様式を理解する上での重要な情報となり得ると考えられる。

### 第三節 考察

本章では種々の変異体の作製およびペプチドとの複合体の構造解析を行い、複製関連タンパク質分子間の相互作用について調べた。第一節では、PolBI の PIP ボックスを含む C-末端は *Pfu*PCNA との相互作用に必須であったが、RFCL では PIP ボックス以外にも *Pfu*PCNA との結合に必須な部位が存在することが示唆された。PIP ボックスペプチドと PCNA の結合様式の詳細が判明し、RFCL の 470 位に相当するグルタミンでは側鎖の窒素及び酸素が各々水素結合のドナー及びアクセプターとして利用されていることや、473 位のロイシンと 476 位のフェニルアラニンの側鎖が *Pfu*PCNA の疎水ポケットに接触していることがわかった。このように PIP ボックスの中でも他の PIP ボックス配列と比べ保存性の高い残基は、*Pfu*PCNA に直接水素結合あるいは疎水性接触をしており、他のアミノ酸への置換が構造上著しく不利になることが示された。また *Pfu*PCNA 側の結合部位は、真核生物の PCNA 変異体を用いた結合活性測定により同定された部位（センターループ、ドメイン間コネクティングループ、疎水ポケット、C-末端ループ）(34)の一部に相当していた。PCNA 側の結合に関与する部位のアミノ酸配列をヒトと *P. furiosus* および酵母の間で比較すると、これらの分子間でよく保存されていることがわかる(Table 4)。しかしながら、結晶中でヒト p21<sup>CIP1/WAF1</sup> のペプチドやバクテリオファージ RB69 の gp43 ペプチド C-末端部分がそれぞれ PCNA や gp45 のドメイン間コネクティングループに結合しているのに対して、RFCL ペプチドの C-末端は、本結晶構造解析の結果では disorder しており、*Pfu*PCNA のドメイン間コネクティングループとの結合が確認

**Table 4. The three target sites on PCNA for the PCNA binding proteins**

	Center loop	Interdomain connecting loop	C-terminal tail loop
Human	41-DSSHV-45	121-LDVEQLGIPEQE-132	253-PKIED-257
<i>P. furiosus</i>	42-DPSRV-46	118-VEEMEVDLPELP-129	245-PRVEE-249
<i>S. pombe</i>	41-DSSHV-45	121-IDQEHILGIPDIE-132	253-PKIIE-257
<i>S. cerevisiae</i>	41-DLSRV-45	121-IDADFLKIEELQ-132	253-PKFND-257

**Identical and similar amino acids residues to Human PCNA at each position are indicated by white letter.**

できなかった。真核生物の PCNA 変異体の解析において PCNA のドメイン間コネクティンググループが p21<sup>CIP1/WAF1</sup> や Pol $\delta$ との相互作用には必要であるが、RFC との相互作用には必要でないことがわかっており(34)、本研究結果においても、RFCL ペプチド-PfuPCNA 複合体結晶中で、結晶構造が決定できなかったことは、この部分での相互作用が安定なものではないと考えられ、RFCL の C-末端部分は PfuRFC と PfuPCNA の結合に重要ではないことを示唆している。

RFCL ペプチド-PfuPCNA 複合体の構造解析の結果から、PCNA 結合タンパク質と PCNA の結合様式は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が、PIP ボックスの役割は PCNA 結合タンパク質を PCNA 上に結合させるだけではなく、PCNA の三量体構造をより安定化させることによって PCNA 結合タンパク質-PCNA 複合体を二本鎖 DNA 上に安定に保持する機能も果たしているという、大変興味深い可能性が示唆された。この点に関してはさらに解析を進めていく必要性があると考えている。

また第二節の RFCS 変異体の解析では C-末端の $\alpha$ ヘリックスの欠失で複合体形成能が消失することがわかった。この結果はヒト RFC の欠失変異体分析の結果と一致する。ヒト RFC のそれぞれのサブユニットで調べられた欠失した C-末端残基数は p140 の 166 残基、p40 の 14 残基、p38 の 63 残基、p37 の 29 残基、p36 の 17 残基で、これらサブユニットの C-末端領域が RFC 複合体形成に必須であることが示されている(38, 39)。本章では解析された *P. furiosus* 由来 RFCS の立体構造の情報

に基づいて、複合体形成に必須な C-末端領域を $\alpha$ ヘリックス一本分の 22 残基に限定し、調べた結果、予想通りここが関与することが判明した。また RFCS の DNA 結合活性には複合体を形成することが重要であることがわかった。

免疫沈降実験により、負に荷電した領域を置換した RFCSm5 は *Pfu*PCNA との相互作用が減少していることがわかり、そのために RFCSm5 を含む変異体では *Pfu*RFC による *Pfu*PCNA 依存的な PolBI の DNA 合成活性を促進する効果が低下したと考えられる。このことは RFCS 複合体の中心の負に荷電した領域は、RFC の機能に貢献していることを示唆している。

予想外に RFCS の変異や C-末端の欠失は ATP 加水分解活性に影響を与えなかった。RFCS $\Delta$ は安定な複合体を形成できないにもかかわらず、RFCL の存在下、非存在下のいずれの場合も、野生型 RFCS と同様の ATP 加水分解活性を示した。この結果はヒト RFC の場合と異なる。ヒト p40 サブユニットは単独で DNA 依存的な ATP 加水分解活性を有し他の四つのサブユニットと複合体を形成することで活性の上昇が見られる(40)。また RFCSm5 および RFCSm2 を含む *Pfu*RFC 複合体の ATP 加水分解活性が野生型 *Pfu*RFC の活性より高かったが、このことは興味深い問題であり、この原因も含めて、RFC における ATP 加水分解活性とクランプローディング活性の関係についてさらに詳細に研究することが必要である。

## 結論

1 *P.furiosus* ゲノム DNA から、真核生物の PCNA, RFC とそれぞれ相同な配列を持つタンパク質に対応する遺伝子をクローニングし、それらが大腸菌内で発現させ、産生されたタンパク質 (*PfuPCNA*, *PfuRFC*) を用いて *in vitro* における性質を調べた結果、以下のことを明らかにした。

- (1) *PfuPCNA* は単独で PolBI および PolD の DNA 合成活性を促進した。
- (2) *PfuRFC* は *PfuPCNA* による PolBI、PolD の DNA 合成活性の促進効果をさらに増大した。
- (3) *PfuPCNA* は仔牛胸腺由来 Pol $\delta$  の DNA 合成活性を促進し、ヒト RFC の ATPase 活性を促進した。

以上の結果は、古細菌におけるゲノム複製過程において、真核生物と同様な複製因子が機能していることを示唆している。

2 *P.furiosus* 由来 PCNA および RFCS の立体構造と機能について調べ、以下の知見を得た。

- (1) *PfuPCNA* はヒト PCNA に類似した三量体環状構造を形成しており、サブユニット間の水素結合の状態から、self-loading 現象が理解できた。
- (2) RFCS の結晶構造解析を行った結果、半円形三量体構造が二つ会合した状態をとっており、これは完全な RFC 複合体における RFCS の機能や構造を詳細に反映すると考えられた。RFCS 複合体構造において C-末端ドメイン同士が密な接触をしている結合様式が明らかになった。

3 種々の変異体の作製及びペプチドとの複合体の構造解析を行い、複製関連タンパク質分子間の相互作用を調べた結果、以下の知見を得た。

- (1) PolBI の PIP-ボックスを含む C-末端は *PfuPCNA* との相互作用に必須であった。
- (2) RFCL では PIP-ボックス以外にも *PfuPCNA* との結合に関与する部位が存在することが示唆された。

- (3) RFCL の PIP-ボックスは *Pfu*PCNA と結合したが、その様式は種間で広く保存されており、またその結合により *Pfu*PCNA の三量体構造は安定化することが示唆された。
- (4) RFCS の C-末端 $\alpha$ ヘリックスは複合体形成に必須であった。
- (5) RFCS 複合体の中心の負に荷電した領域は *Pfu*PCNA との相互作用に貢献することが示唆された。

本研究を通して得られた知見は今後の DNA 複製の分子機構の全体像を解明する上で重要な貢献を果たすものと考えられる。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 土井健史教授に深く感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、ご指導を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 小林祐次教授、西原 力教授、大阪大学大学院生命機能研究科 花岡文雄教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導賜り、多大の激励をいただきました九州大学大学院農学研究院 石野良純教授に深く感謝いたします。

生物分子工学研究所 小森加代子博士、I. K. O. Cann 博士 (現 University of Illinois)、湯浅美穂子氏 (現理化学研究所) ならびに九州大学大学院理学研究院 釣本敏樹教授には、分子機能解析研究を行うにあたり有益なご助言とご協力をいただきました。心より御礼申し上げます。

生物分子工学研究所 森川耿右副所長をはじめ、大山拓次博士、松宮茂樹博士、西田洋一博士、真柳浩太博士には、構造解析研究を行うにあたりご指導とご協力を賜りました。心より感謝いたします。

京都大学化学研究所バイオインフォマティクスセンター 藤 博幸教授ならびに大安裕美博士には、情報解析研究に関して有益なご助言とご討論をいただきました。心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、生物分子工学研究所の皆様にはたいへんお世話になりました。深く感謝いたします。

折りにふれ激励を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 田中徹明教授、大阪大学微生物病研究所 品川日出夫教授に心より感謝いたします。

大阪大学名誉教授 池原森男先生には終始激励を賜りました。厚く御礼申し上げます。



## 実験の部

### 実験材料

#### <菌株>

<i>Pyrococcus furiosus</i> Vc1	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM)
<i>Escherichia coli</i> JM109	宝酒造
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Novagen
<i>Escherichia coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RIL	Stratagene

#### <プラスミド>

pT7 Blue	Novagen
pGEM-T easy	Promega
pET15b	Novagen
pET21a	Novagen
pET28a	Novagen

#### <酵素>

制限酵素など各種 DNA 関連酵素は、宝酒造、New England Biolabs、東洋紡績、Stratagene のものを用いた。

#### <抗体>

各タンパク質に対するウサギ抗血清の作製は宝酒造に依頼した。

#### <ペプチド>

RFCL PIP ボックスペプチド (KQATLFDLKK) および PoIBI PIP ボックスペプチド

ド (KTRQVGLTSWLNIKKS) は生物分子工学研究所、田中俊樹博士より供与された。コントロールペプチド(RRLIEDAEYAARG)は Peptide Institute Inc.社製の市販品を用いた。

#### <DNA>

各種合成オリゴ DNA	Amersham Biosciences
poly(dA) <sub>200</sub>	Amersham Biosciences
oligo(dT) <sub>25-30</sub>	Amersham Biosciences

#### <カラムおよび樹脂>

HiTrap Q column	Amersham Biosciences
HiTrap SP column	Amersham Biosciences
HiTrap Heparin column	Amersham Biosciences
Superdex 200 PC3.2/30 column	Amersham Biosciences
Econo-Pac CHT-II column	Bio-Rad
TALON-NX Metal Resin	Clontech
Protein A Sepharose 4FF resin	Amersham Biosciences

#### <一般試薬>

試薬はそれぞれ用いた方法の項中にそれらの由来を明記した。その他の試薬はナカライテスク、和光純薬工業のものを使用した。

#### <機器>

DNA シーケンサー (Model 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems
液体クロマトグラフ装置 (AKTA explorer 10S)	Amersham Biosciences
分析用液体クロマトグラフ装置 (SMART systems)	Amersham Biosciences
分光光度計 (Model Du640 spectrophotometer)	Beckman
イメージアナライザー (BAS-5000)	Fuji Film

## 方法

## ＜各種溶液の組成＞

- ・緩衝液 A      50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 % グリセリン; 2 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール; 0.1 mM EDTA
- ・緩衝液 B      50 mM Tris-HCl, pH8.0; 10%グリセリン; 0.5 mM ジチオトレイトール; 0.1 mM EDTA
- ・緩衝液 C      10 mM リン酸カリウム, pH 6.8; 10 %グリセリン; 7 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール; 0.05 mM 塩化カルシウム
- ・緩衝液 D      20 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.3 M 塩化ナトリウム
- ・緩衝液 E      50 mM リン酸カリウム, pH 6.8; 10 %グリセリン; 7 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール
- ・PBS            10 mM リン酸ナトリウム, pH 7.5; 0.15 M 塩化ナトリウム

## ＜PCNA、RFCS、RFCL 発現用プラスミドの構築＞

PCNA、およびRFCLをコードする遺伝子は、それぞれ下表に示すPCNAF-PCNARまたはRFCLF-RFCLRプライマーセットを用いて *P. furiosus* のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った。PCR には最も正確性の高い PfuDNA Polymerase (Stratagene)を用いた(以後の PCR についても全て本酵素を用いた)。増幅された各 PCR 産物を pT7 Blue に TA クローニングし、それぞれ DNA シークエンシングを行って、配列が正しいことを確認した。PCNA および RFCL をコードする遺伝子を保

PCNA およびRFCL発現用プラスミド構築のためのPCRに用いたプライマー

フラグメント	プライマー	配列	下線
PCNA	PCNAF	5'- <u>ACATATG</u> CCATTTGAAATCGTATTTGA-3'	<i>Nde</i> I
	PCNAR	5'-ATCGC <u>CTCGAGT</u> CACTCCTCAACCCTTGGGGCTAGCAGG-3'	<i>Xho</i> I
RFCL	RFCLF	5'-AGC <u>CATATG</u> CCAGAGCTTCCCTGGGTAGAA-3'	<i>Nde</i> I
	RFCLR	5'-AGG <u>TCGACT</u> CACTTTTTAAGAAAGTCAAAGAGAG-3'	<i>Sal</i> I

持っている pT7 Blue を *Nde*I-*Xho*I または *Nde*I-*Sal*II により処理し、pET21a または pET28a の *Nde*I-*Xho*I 部位または *Nde*I-*Sal*II 部位に挿入した。構築したプラスミドをそれぞれ pTPCNA および pTRFLhis とした。

RFCS をコードする遺伝子はインテインを含むため、まず下表の RFCSF1-RFCSR2 または RFCSF2-RFCSR1 のプライマーセットで *P. furiosus* のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行い、RFCS N-末端のエキステインと RFCS C-末端のエキステインをコードするフラグメントを増幅させた。二つのエキステインを連結するために、RFCSF1-RFCSR1 のプライマーセットで二つのエキステインをコードするフラグメントを鋳型にして、第二の PCR を行った。増幅された PCR 産物を pT7 Blue に TA クローニングし DNA シークエンシングを行って配列が正しいことを確認した。RFCS をコードする遺伝子を保持している pT7 Blue を *Nde*I-*Sal*II により処理し、pET21a の *Nde*I-*Sal*II 部位に挿入した。構築したプラスミドを pTRFS とした。

RFCS発現用プラスミド構築のためのPCRに用いたプライマー

フラグメント	プライマー	配列	下線
RFCS-N	RFCSF1	5'-TCATATGAGCGAAGAGATTAGAGAAGTTAAG-3'	<i>Nde</i> I
	RFCSR2	5'-CAAGGGCCAAAGCCGCTGTAGTCTTTCCGACACC-AGGGGGGCCTG-3'	
RFCS-C	RFCSF2	5'-GCAGGCCCCCCCTGGTGTCGGAAAGACTACAGCGG-CTTTGGCCCTTG-3'	
	RFCSR1	5'-AGGTCGACCATCACTTCTTCCCAATTAGGGTGAAC-3'	<i>Sal</i> I

#### <RFCS の部位特異的変異体発現用プラスミドの調製>

RFCS の変異体 m5 および m2 の調製には QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いた。pTRFS プラスミドを鋳型に、forward および reverse プライマーには相補的で変異を導入した配列を用いた(下表に forward プライマーの配列を示す)。操作マニュアルに従い反応を行い変異の導入を DNA シークエンシングにより確認し、それぞれ pTRFSm5 および TRFSm2 とした。

RFCS変異体発現用プラスミド構築のためのPCRに用いたプライマー  
(変異の導入部位を小文字で示す)

変異体	変異部位	配列
m5	E260A-E270A-D271A	5'-GAAAAGCTTAGGGcGATACTTCTCAAGCAA-GGACTTAGTGGAGcAGcTG TACTAGTTCAG-3'
	E306A-E310A	5'-ACTTCAGACTCGTTGcAGGGGCTAATGcAAT-AATTCAGATTGA-3'
m2	E270A	5'-AAGGACTTAGTGGAGcAGATGTACTAGTTC-3'
	E310A	5'-TTGAAGGGGCTAATGcAATAATTCAGCTTG-3'

<RFCS および RFCL の C-末端欠失変異体発現用プラスミドの調製>

下表に示す RFCSDF-RFCSDR または RFCLDF-RFCLDR プライマーセットを用いて pTRFS または pTRFLhis をそれぞれ鋳型にして PCR を行った。増幅された各 PCR 産物を pGEM-T easy に TA クローニングした後、それぞれ DNA シークエンシングによって配列を確認した。RFCS $\Delta$ および RFCL $\Delta$ をコードする遺伝子を保持している pGEM-T easy をそれぞれ *Nde*I-*Sal*I により処理し、pET21a または pET15b の *Nde*I-*Sal*I 部位に挿入した。構築したプラスミドをそれぞれ pTRFS $\Delta$ および pTRFL $\Delta$ とした。

RFCSのC-末端欠失変異体構築のためのPCRプライマー

プライマー	配列	下線
RFCSDF	5'-GG <u>CATATGAGCGAAGAGATTAGAGAAGTTA</u> -3'	<i>Nde</i> I
RFCSDR	5'-GGG <u>TCGACTTAAACGAGTCTGAAGTTATAC</u> -3'	<i>Sal</i> I

RFCLのC-末端欠失変異体構築のためのPCRプライマー

プライマー	配列	下線
RFCLDF	5'-AGCC <u>CATATGCCAGAGCTTCCTGGGTAGAA</u> -3'	<i>Nde</i> I
RFCLDR	5'-GGG <u>TCGACTTATTTCTTTGGCTTTTCCTTT</u> -3'	<i>Sal</i> I

### <組換え PCNA タンパク質の調製>

pTPCNA によって形質転換させた大腸菌 BL21(DE3)株を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンを含む LB 培地で 37  $^{\circ}\text{C}$  にて培養し OD<sub>600</sub> が 0.3 になった時点でイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度が 0.2 mM になるよう添加した。さらに 2 時間培養した後、培養液を遠心して集菌した。集菌した菌体を 1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)および 0.1 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A に懸濁した。超音波処理によって細胞を破碎し、遠心分離により粗抽出液を回収した。80  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間熱処理を行い沈殿物を除いた後、塩化ナトリウムを最終濃度 0.58 M、polyethyleneimine(Sigma)を 0.2 %になるよう添加し、4  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分攪拌した後遠心分離により上清を回収した。この上清に硫酸アンモニウムを 80 %飽和溶液になるよう添加してタンパク質を沈澱させて回収した。沈澱を緩衝液 B に溶解し、緩衝液 B で透析した後、陰イオン交換カラム(HiTrapQ; Amersham Biosciences)に添加した。カラム容量の 10 倍量の緩衝液 B を用いて 0-1 M 塩化ナトリウムの直線濃度勾配で展開し、約 0.5 M 塩化ナトリウムの画分に溶出された *Pfu*PCNA を回収した。溶液中の *Pfu*PCNA 濃度は 280nm における吸光度を測定し、分子吸光係数 7,250  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  より決定した(22)。

### <組換え RFCS タンパク質の調製>

pTRFS によって形質転換させた *Epicurian coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株 (Stratagene)を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンおよび 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  クロラムフェニコールを含む LB 培地で IPTG による誘導をかけずに 30  $^{\circ}\text{C}$  にて 16 時間培養し、培養液を遠心して集菌した。集菌した菌体を 1 mM PMSF および 0.1 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A に懸濁した。超音波処理によって細胞を破碎し、遠心分離により粗抽出液を回収した。80  $^{\circ}\text{C}$  で 20 分間熱処理を行うことにより沈殿物を除いた後、polyethyleneimine を 0.15 %になるよう添加し、4  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間攪拌した後、遠心分離により上清を回収した。この上清に硫酸アンモニウムを 80 %飽和溶液になるよう添加してタンパク質を沈澱させて回収した。沈澱を緩衝液 C に溶解し、緩衝液 C で透析した後、ハイドロキシアパタイトカラム(Econo-Pac CHT-II; Bio-Rad)に添加した。カラム容量と同量の緩衝液 C でカラムを洗浄した後、1 M リン酸カリウム、

pH 6.80 を 0-60 %の濃度勾配になるようカラム容量の 8 倍量で展開した。RFCS は約 0.35 M リン酸カリウムの画分に溶出された。溶出された RFCS 画分は 0.1 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 B に透析した。溶液中の RFCS 濃度は 280 nm における吸光度を測定し、分子吸光係数  $19,060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  より決定した(22)。

#### <組換え RFCL タンパク質の調製>

pTRFLhis によって形質転換させた *Epicurian coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株(Stratagene)を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンおよび 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  クロラムフェニコールを含む LB 培地で 37 °C にて培養し OD<sub>600</sub> が 0.4 になった時点で IPTG を最終濃度が 0.25 mM になるよう添加した。さらに 20 °C で 24 時間培養した後、培養液を遠心して集菌した。集菌した菌体を緩衝液 D に懸濁した。超音波処理によって細胞を破碎し、遠心分離により粗抽出液を回収した。あらかじめ緩衝液 D で平衡化したメタルアフィニティカラム(TALON-NX Metal Resin; Clontech)に粗抽出液を添加し、洗浄液(5 mM イミダゾールを含む緩衝液 D)をカラムの 10 倍容量用いて洗浄した後、吸着しているタンパク質を溶出液(100 mM イミダゾールを含む緩衝液 D)で溶出させた。溶出された RFCL 画分は 0.3 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 B に透析した。溶液中の RFCL 濃度は 280 nm における吸光度を測定し、分子吸光係数  $66,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  より決定した(22)。

#### <RFC 複合体タンパク質の調製>

精製した RFCS と RFCL をそれぞれ 280 nm における吸光度が約 2:1 になるように混合し 60 °C で 20 分間静置し、0.1 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 E に透析した後、陰イオン交換カラム(HiTrapQ; Amersham Biosciences)に添加した。カラム容量の 10 倍量の緩衝液 E を用いて 0.1-1 M 塩化ナトリウムの直線濃度勾配で展開すると、過剰の RFCS はカラムに吸着せず *Pfu* RFC は約 0.3 M 塩化ナトリウムの画分に溶出された。溶出された *Pfu* RFC を含む溶液はさらに緩衝液 E を用いて 1:3 に希釈し、アフィニティカラム(HiTrap Heparin; Amersham Biosciences)に添加した。カラム容量の 10 倍量の緩衝液 E を用いて 0.1-1 M 塩化ナトリウムの直線濃度勾配で展開すると、*Pfu* RFC は約 0.3 M 塩化ナトリウムの画分に溶出された。*Pfu* RFC

の画分を 0.2 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 B に透析した。

#### <P. furiosus の培養と粗抽出液の調製>

*P. furiosus* Vc1 は 98 °C で静置培養した。*P. furiosus* 培地の 1 L あたりの各成分量は、トリプトン(DIFCO laboratories)10 g、イーストエキストラクト(DIFCO laboratories) 5 g、Jamarin S (Jamarin Laboratory)の粉末 35 g、溶液 5 ml、可溶性デンプン 10 g、Trace elements 10 ml である。Trace elements (100 倍濃縮)の 1 L あたりの各成分量は、nitrilacetic acid 1.5 g、硫酸マグネシウム 3 g、塩化ナトリウム 1 g、硫酸鉄(II)0.1 g、硫酸コバルト 0.1 g、塩化カルシウム 0.1 g、硫酸亜鉛 0.1 g、硫酸銅 10 mg、硫酸ヨウ素カリウム 10 mg、ホウ酸 10 mg、モリブデン酸ナトリウム 10 mg、塩化ニッケル 25 mg、であり、水酸化カリウム水溶液を用いて pH 7 に調整した。2 g の *P. furiosus* 細胞を 0.1 mM の PMSF を含む緩衝液 B 30 ml 中で超音波破碎し、遠心 (BECKMAN XL-90、100,000×g、60 min) して沈殿を除き、細胞粗抽出液を得た。

#### <化学的クロスリンク法>

*Pfu*PCNA をクロスリンク反応液 (20 mM リン酸ナトリウム,pH 7.0、150 mM 塩化ナトリウム) で 60 µg/ml になるように調製し、EGS (ethylene glyco-bis (succinimidyl succinate)) (SIGMA) を 50 µM になるよう添加し、室温で 10 秒~1 分間反応させた。反応は停止液 (0.25 M TrisHCl, pH 6.8) を反応液の 1/4 量加えて終了させた。反応生成物についてウエスタンブロット法により分析を行った。

#### <分析ゲルろ過クロマトグラフィー法>

精製した *Pfu*PCNA、RFCS、RFCL、*Pfu*RFC、および RFCS、*Pfu*RFC の変異体について、SMART system を用いてゲルろ過クロマトグラフィー分析を行った。カラムに Superdex 200 PC3.2/30 (Amersham Biosciences)を、移動相に 0.15 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 B を用いた。サイズマーカー用のタンパク質標品としてゲルろ過標準品 (Bio-Rad) を同じ条件下で用いた。



### <免疫沈降法>

精製した *Pfu*PCNA、RFCS、RFCL、PolBI、および PolD を用いてウサギを免疫し、得られた抗血清を用いた。すべての操作は室温で行った。30  $\mu$ l の protein A Sepharose を PBS で 3 回洗浄した後、それぞれの抗血清 10 $\mu$ l を加え 1 時間反応させた。PBS で 2 回および緩衝液 B で 1 回洗浄した。300  $\mu$ l の *P. furiosus* 細胞粗抽出液、または 500 ng の精製した組換えタンパク質、0.1 mM PMSF、0.1 % BSA および 50 mM 塩化ナトリウムを含む緩衝液 B 300  $\mu$ l を加えて 30 分間反応させた。protein A Sepharose 結合画分は遠心して分離し 0.1mM PMSF および 50 mM 塩化ナトリウムを含む緩衝液 B で 3 回洗浄した。protein A Sepharose 結合画分について、ウェスタンブロット法により分析を行った。

### <プライマー伸長反応>

*P. furiosus* PolBI および PolD は文献 41、42 にしたがって調製した。DNA 合成は 50 mM Tris-HCl, pH 8.8、5 mM 塩化マグネシウム、2 mM メルカプトエタノール、125 mM 塩化ナトリウム、および 0.25 mM dNTP を含む 25  $\mu$ l の反応溶液中で、70 °C、4 分間の反応を基本として行った。項中に記した場合以外は 0.2  $\mu$ g M13mp18 一本鎖 DNA と 5'末端を <sup>32</sup>P 標識した DNA プライマー、および 0.25 units DNA ポリメラーゼを用いて、20 nM *Pfu*PCNA、および 20 nM *Pfu*RFC の存在下または非存在下で反応を行った。8  $\mu$ l の反応停止溶液(98 % deionized formamide, 1 mM EDTA, 0.1 % xylene cyanol)を加えて反応を停止した。DNA 合成産物を 50 mM 水酸化ナトリウム、1 mM EDTA 溶液中 1 %アルカリアガロースゲルで電気泳動により分離し、オートラジオグラフィーにより可視化した。

### <ATP 加水分解反応>

*Pfu*RFC の ATP 加水分解反応は 25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 6 mM 塩化マグネシウム; 0.1 mM ジチオトレイトール; 0.05 % BSA を含む 20  $\mu$ l の反応溶液中で行った。*Pfu*RFC を項中に記した濃度で、必要に応じて *Pfu*PCNA、DNA とともに用いて 0.1 mM ATP および [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP(0.1mCi/ml)と、65 °C で反応させた。任意の時間経過後に反応溶液 1  $\mu$ l を polyethyleneimine-cellulose TLC プレート (Merck) にスポッ

トし、0.5 M 塩化リチウム、1 M ギ酸溶液で展開した。イメージアナライザー (BAS-5000, Fuji Film) を用いて加水分解産物の定量を行った。

#### <DNA 結合実験 (ゲルシフトアッセイ) >

基質として DNA (5'-AGCTACCATGCCTGCACGAATTAAGCAATTCGTAATCATGGTCATAGCT-3') の 5'-末端を  $^{32}\text{P}$  でラベルし、一本鎖 DNA (ssDNA) とした。ssDNA に相補的な配列を有する DNA をアニールして二本鎖 DNA(dsDNA) とした。また ssDNA に DNA (5'-AGCTATGACCATGATTACGAATTGCTT-3') をアニールしプライマー構造 DNA (priDNA) とした。項中に記した量の RFCS、*Pfu*PCNA、および *Pfu*RFC を単独であるいは混合して用いて、25 mM Tris-HCl, pH 8.0; 6 mM 塩化マグネシウム; 0.1 mM ジチオトレイトール; 0.05 % BSA を含む 10  $\mu\text{l}$  の反応溶液中で 5 nM DNA と 60 °C で 5 分間反応させた。必要に応じて 0.1 mM ATP、dATP、ATP $\gamma$ S を加えた。反応生成物を 0.1  $\times$  TAE 溶液中 1 %アガロースゲルの電気泳動により分離し、オートラジオグラフィーにより可視化した。

#### <DNA 結合実験 (フィルターバインディングアッセイ) >

基質として poly(dA)<sub>200</sub> の 5'-末端を  $^{32}\text{P}$  でラベルし、一本鎖 DNA とした。この poly(dA)<sub>200</sub> に oligo(dT)<sub>25-30</sub> をモル比 1:4 でアニールし、プライマー構造 DNA として用いた。*Pfu*RFC(50, 250, 500 ng)を 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM 塩化マグネシウム, 0.1 mM ジチオトレイトール, 0.05 % BSA および 20 nM DNA を含む 20  $\mu\text{l}$  の反応溶液中で 60 °C で 5 分間反応させた。DNA 結合 *Pfu*RFC を、アルカリ処理したニトロセルロースフィルターに吸着させ、0.5 mL の 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 を用いて 3 回洗浄した後、シンチレーションカウンターを用いて結合している DNA を定量した。

#### <PCNA-PIP box ペプチド複合体および RFCS の結晶構造解析>

*Pfu*PCNA に対して過剰量の RFCL の C 末端ペプチド (KQATLFDLKK) を添加した溶液から、硫酸アンモニウムを沈澱剤とする蒸気拡散法によって、六角柱状の結晶を得た。シンクロトロン放射光施設フォトンファクトリーの BL6B ビームライ

ンにおいて、低温の窒素気流を吹き付け 100 K に冷却した結晶を用いて X 線回折測定を行い、得られた 2.3 Å 分解能までのデータに基づいて結晶構造解析を行った。PfuPCNA 単体の分子構造 (PDB 登録番号 1GE8) をサーチモデルとして分子置換法を行い、初期位相を決定した後、シミュレーテッドアニーリング法による構造精密化と差フーリエ合成電子密度図を利用した分子モデルの構築とを繰り返して最終構造を得た。主な結晶データは以下の通りである：空間群  $P6_3$ ,  $Z=6$ ,  $a=91.847$ ,  $c=64.144$  Å,  $R=0.235$ ,  $R_{\text{free}}=0.291$ 。また RFCS の結晶化は、2-メチルペンタンジオール(MPD) を沈澱剤として、蒸気拡散法によって行ない、得られた結晶について同様に X 線回折測定を行なった。得られた 2.8 Å 分解能までのデータに基づいて解析を行ない、空間群  $P2_12_12_1$ , 単位胞のパラメータはそれぞれ  $a=98.3$  Å,  $b=105.6$  Å,  $c=316.9$  Å であった。一つの非対称単位中に 6 つのサブユニットが含まれていた。回折 X 線の位相を決定するために  $\text{Ta}_6\text{Br}_{14}$  を用いた重原子同型置換体を浸漬法によって作成した。またメチオニン要求性の大腸菌 B832(DE3) を宿主として RFCS 遺伝子を発現させ、M9 培地中セレノメチオニンとメチオニン以外の 19 種のアミノ酸を用いて、セレノメチオニン置換体を作成した。得られたデータをもとに結晶構造モデルを求め精密化した。  $R=0.224$ ,  $R_{\text{free}}=0.277$  であった。

## 引用文献

1. Diffley, J. F. X. (2001) DNA replication: Building the perfect switch. *Curr. Biol.* **11**, R367-R370.
2. Myung, K., Datta, A., and Kolodner, R. D. (2001) Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**, 397-408.
3. Olsen, G.J. and Woese, C. R. (1997) Archaeal genomics: an overview. *Cell* **89**, 991-994.
4. Cann, I., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa K., and Ishino, Y. (1999) Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* **181**, 6591-6599.
5. Cann, I., Ishino, S., Yuasa, M., Daiyasu, H., Toh, H., Morikawa, K., and Ishino, Y. (2001) Biochemical analysis of replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **183**, 2614-2623.
6. Ishino, Y., Tsurimoto, T., Ishino, S., and Cann, I. (2001) Functional interactions of an archaeal sliding clamp with mammalian clamp loader and DNA polymerase  $\delta$ . *Genes Cells* **6**, 699-706.
7. Oyama, T., Ishino, Y., Cann, I., Ishino, S., and Morikawa, K. (2001) Atomic structure of the clamp loader small subunit from *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Cell* **8**, 455-463.
8. Matsumiya, S., Ishino, S., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2002) Physical interaction between proliferating cell nuclear antigen and replication factor C from *Pyrococcus furiosus*. *Genes Cells* **7**, 911-922.
9. Ishino, S., Oyama, T., Yuasa, M., Morikawa, K., and Ishino, Y. (2003) Mutational Analysis of *Pyrococcus furiosus* Replication Factor C based on the Three-Dimensional Structure. *Extremophiles* **7**, 169-175.
10. Matsumiya, S. Ishino, S., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2003) Intermolecular ion pairs maintain the toroidal structure of *Pyrococcus furiosus* PCNA. *Prot. Sci.* **12**, 823-831.

11. 吉田松年、花岡文雄 (2002) DNA ポリメラーゼにおける新しい分子種の発見と研究の展開 *生化学* **74**, 183-186.
12. Cann, I. K. O. and Ishino, Y. (1999) Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics* **152**, 1249-1267.
13. Hingorani, M. M. and O'Donnell, M. (2000) A tale of Toroids in DNA metabolism. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**, 22-30.
14. Bruck, I. and O'Donnell, M. (2001) The ring-type polymerase sliding clamp family. *Genome Biol.* **2**, 3001.1-3001.3.
15. Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, H., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Yoshizawa T., Nakamura, Y., Robb, F.T., Horikoshi, K., Masuchi, Y., Shizuya, H., and Kikuchi, H. (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* **5**, 55-76.
16. Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H.-M., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicare, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Safer, H., Patwell, D., Prabhakar, S., McDougall, S., Shimer, G., Goyal, A., Pietrovski, S., Church, G.M., Daniels, C.J., Mao, J.-i., Rice, P., Nolling, J., Reeve, J.N. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DH: Functional analysis and Comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**, 7135-7155.
17. Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton,

- G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.K., Badger, J.H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weidman, J.F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes, S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R., Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* **390**, 364-370.
18. Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G, Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.-F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S.M., Weidman, J.F., Fuhrmann, J.L., Presley, E.A., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Hurst, M.A., Roberts, K.M., Kaine, B.P., Borodovsky, M., Klenk, H.-P., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R., Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-1073.
19. Jarvis, T.C., Paul, L. S., and von Hippel, P. H. (1989) Structural and enzymatic studies of the T4 DNA replication system. I. Physical characterization of the polymerase accessory protein complex *J. Biol. Chem.* **264**, 12709-12716.
20. Mossi, R. and Hubscher, H. (1998) Clamping down on clamps and clamp loaders- the eukaryotic replication factor C. *Eur. J. Biochem.* **254**, 209-216.
21. Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Kubota, K., Nakamura, Y., Nomura, N., Sako, Y., Kikuchi, H. (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* **6**, 83-101.

22. Gill, S.C., and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acids sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
23. Kelman, Z. and Hurwitz, J. (2000) A unique organization of the protein subunits of the DNA polymerase clamp loader in the archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*  $\Delta$ H. *J. Biol. Chem.* **275**, 7327-7336.
24. Pisani, F.M., De Felice, M., Carpentieri, F., and Rossi, M. (2000) Biochemical characterization of a clamp-loader complex homologous to eukaryotic replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **301**, 61-73.
25. Henneke, G., Gueguen, Y., Flament, D., Azam, P., Querellou, J., Dietrich, J., Hubscher, U, and Raffin, JP. (2002) Replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi* does not need ATP hydrolysis for clamp-loading and contains a functionally conserved RFC PCNA-binding domain. *J. Mol. Biol.* **323**, 795-810.
26. Lee, S.H., Kwong, Z.Q., and Hurwitz, J. (1991) Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase  $\delta$ . *J. Biol. Chem.* **266**, 594-602.
27. Tsurimoto, T., and Stillman, B. (1991) Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA-structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 1950-1960.
28. Matsumiya, S., Ishino Y., and Morikawa, K. (2001) Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen of *Pyrococcus furiosus*. *Protein Sci.* **10**, 17-23.
29. Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (1996) Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* **87**, 297-306.
30. Krishna, T. S., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M., and Kuriyan, J. (1994) Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**, 1233-

1243.

31. Kong, X. P., Onrust, R., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (1992) Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* **69**, 425-437.
32. Mayanagi, K., Miyata, T., Oyama, T., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2001) Three-dimensional electron microscopy of clamp loader small subunit from *Pyrococcus furiosus*. *J. Struct. Biol.* **134**, 35-45.
33. Jeruzalmi, D., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2001) Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* **106**, 429-441.
34. Tsurimoto, T. (1999) PCNA binding proteins. *Front. Biosci.* **4**, 849-858.
35. Warbrick, E. (2000) The puzzle of PCNA's many partners. *BioEssays* **22**, 997-1006.
36. Shamoo, Y. and Steitz, T. A. (1999) Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex. *Cell* **99**, 155-166.
37. Nicholls, A., and Honig, B. J. (1991) A rapid finite-difference algorithm, utilizing successive over-relaxation to solve the Poisson-Boltzmann equation. *J. Comput. Chem.* **12**, 435-445.
38. Uhlmann, F., Cai, J., Gibbs, E., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. (1997) Deletion analysis of the large subunit p140 in human replication factor C reveals regions required for complex formation and replication activities. *J Biol. Chem.* **272**, 10058-10064.
39. Uhlmann, F., Gibbs, E., Cai, J., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. (1997) Identification of regions within the four small subunits of human replication factor C required for complex formation and DNA replication. *J Biol. Chem.* **272**, 10065-10071.
40. Podust, V.N., Tiwari, N., Ott, R., and Fanning, E. (1998) Functional interactions among the subunits of replication factor C potentiate and modulate its ATPase activity. *J Biol. Chem.* **273**, 12935-12942.



41. Komori, K, and Ishino, Y. (2000) Functional interdependence of DNA polymerizing and 3'→5' exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I. *Protein Eng.* **13**, 41-47.
42. Ishino, Y., and Ishino, S. (2001) DNA polymerases from Euryarchaeota. *Meth. Enzymol.* **334**, 249-260.

