

Studies on the activation of the replicative helicase from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*

尾木野, 弘実

<https://hdl.handle.net/2324/1500787>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名	尾木野 弘実			
論 文 名	Studies on the activation of the replicative helicase from the thermophilic archaeon, <i>Thermoplasma acidophilum</i> (好熱性アーキア <i>Thermoplasma acidophilum</i> における DNA 複製ヘリカーゼ活性化機構に関する研究)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	石野 良純
	副 査	九州大学	教授	木村 誠
	副 査	九州大学大学院システム生命科学府	教授	神田 大輔

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

DNA 複製の開始段階において二本鎖 DNA が解離した後、ヘリカーゼが装着されて複製前複合体 (pre-RC) が形成される。本論文は、pre-RC から複製フォークの進行に進む過程の分子機構解明を目指して、好熱好酸性アーキアの一種である *Thermoplasma acidophilum* を材料に用いて研究した結果をまとめたものである。真核生物ではヘリカーゼの触媒活性を担う MCM (mini-chromosome maintenance 複合体) が Cdc6、Cdt1 に依存して複製起点上に pre-RC を形成した後、DNA 上に乗った MCM は GINS、Cdc45 と共に「CMG 複合体 (三者の頭文字をとって命名された)」を形成して複製ヘリカーゼ複合体として活性化されることが提唱されている。真核生物の GINS は四種類の異なるタンパク質からなるヘテロ四量体であり、アミノ酸配列の相同性からその全てのタンパク質は共通の祖先から進化したと考えられる。アーキアには Gins タンパク質を一種類 (Gins51) しか有さないものが多く存在し、アーキアにおける GINS 複合体の構造と機能についての理解が遅れていた。

本論文ではまず、Gins51 のみを持つアーキアのうち、*T. acidophilum* を用いて Gins51 の構造及び機能の解析を行った。Gins51 タンパク質を高純度に精製し、ゲル濾過クロマトグラフィー及び電子顕微鏡観察を行い、Gins51 が安定な四量体を形成することを明らかにした。配列比較の結果、Gins51 しか持たないアーキアでは Gins タンパク質に広く保存された A、B 両ドメインの間に、天然変性状態と予想される領域が存在することを指摘した。さらに変異体解析により、この変性領域が四量体の形成に必須であることを示し、Gins51 のみを有するアーキアでは、ホモ四量体の GINS 形成のために特有の構造を獲得したことを提唱した。次に Gins51 が MCM の機能に与える影響を調べ、Gins51 存在下で MCM の ATPase、ヘリカーゼ活性が促進されることを明らかにした。この結果は、ホモ四量体の GINS が機能的に働くことを初めて示したものである。

また本論文は、*T. acidophilum* に複製起点認識因子である Cdc6/Orc1 様のタンパク質が二種類 (Cdc6-1、Cdc6-2) 存在することに注目し、ゲルシフトアッセイによって、MCM、Gins51、Cdc6-2 が一本鎖 DNA 上で複合体を形成することを明らかにした。さらに、Gins51、Cdc6-2 の存在下では MCM の DNA 結合量が上昇し、Gins51 と Cdc6-2 両方が存在する場合に MCM は最も安定に DNA 上に存在しうること示した。また、Cdc6-2 と GINS の共存下では、それぞれ単独で存在する場合に比べて、MCM のヘリカーゼ活性がより促進されることも明らかにした。さらに、*T. acidophilum* 細胞抽出液を用いた免疫沈降実験の結果においても、MCM、Gins51、Cdc6-2 は細胞内において一時的に同じ複体内に存在しうること示した。

CMG 複合体構成要素のうちの Cdc45 に相当するタンパク質がアーキアには存在しないとされてきたが、近年、アーキアの持つ RecJ 様タンパク質 GAN (GINS-associated nuclease) が Cdc45 と配列上の相同性を有することが指摘され、アーキアにおける複製ヘリカーゼ複合体への関与が予想された。本論文では、*T. acidophilum* に存在する 2 種類の RecJ (RecJ1、RecJ2) のうち、RecJ1 は GINS と相互作用しないが、RecJ2 は GINS と安定な複合体を形成し、その相互作用には Gins51 の B ドメインが必須であることを発見した。しかし、RecJ2 存在下で MCM のヘリカーゼ活性の上昇は検出されなかった。Gins51 の B ドメイン欠失変異体は Gins51 全長分子と同じ効率で MCM のヘリカーゼ活性を促進することから、MCM の活性化には Gins51 の B ドメインと RecJ2 は関与していないことを提唱し、*T. acidophilum* は、アーキアと真核生物に分岐した後で、Cdc45/RecJ を用いずに Cdc6 ホモログを用いて MCM を活性化する独特の機構を獲得した可能性を議論した。

以上、本論文はアーキアの複製ヘリカーゼ複合体に関する多くの新しい知見を提供し、アーキア・真核生物型の複製装置の構造と機能、および進化に関する理解の進展に貢献した。すなわち、本論文は分子生物学および蛋白質科学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本申請者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。