

Human CTF18-RFC complexed with DNA polymerase ϵ loads PCNA efficiently and maintains the DNA synthesis

藤澤, 遼

<https://doi.org/10.15017/1931744>

出版情報 : 九州大学, 2017, 博士 (理学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名：藤澤 遼

論 文 名：Human CTF18-RFC complexed with DNA polymerase ϵ loads PCNA
efficiently and maintains the DNA synthesis

(ヒト DNA ポリメラーゼ ϵ と結合した CTF18-RFC による
PCNA ローディングはその DNA 合成の継続に寄与する)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物の DNA スライディングクランプ PCNA は primer-template DNA 構造の 3'-プライマー末端に ATPase 活性を持つ主要ローダー複合体 RFC によってローディングされる。この PCNA は DNA 複製そのものだけでなく DNA 複製と連動した DNA 損傷修復、クロマチン再構築、姉妹染色体接着、細胞周期制御など種々の機能因子の DNA 上での足場として必須の役割を果たす。PCNA ローダーには RFC に加えて二次的な複合体 CTF18-RFC が存在する。両者は共に DNA 複製に寄与することが示されているが、それらの機能分担の仕組みは不明である。ゲノム DNA の複製において DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) はリーディング鎖を、DNA ポリメラーゼ δ (Pol δ) はラギング鎖を主に合成すると考えられている。これまでに CTF18-RFC と Pol ϵ が特異的に結合し、その結合がゲノムの安定性維持に重要であることが報告されている。私は精製タンパク質を用いて両者の結合が PCNA のローディング、DNA 合成にどのような機能を持つかを解析した。

まず、CTF18-RFC 単独では通常の DNA 複製が起こる状態を反映した生理的イオン濃度、一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA が存在する条件では、RFC と比べて非常に低い PCNA ローディング活性しか持たなかった。しかし Pol ϵ が存在すると、このような条件下でも活性が維持されたことから CTF18-RFC は Pol ϵ と複合体を形成している時が機能状態であることが分かった。さらに primer-template DNA 構造での両者の結合位置を DNA 部位特異的クロスリンクによって解析した。その結果 3'-プライマー末端とその鋳型側に Pol ϵ が安定に結合し、それを鋳型とする CTF18-RFC が PCNA ローディング時に一時的に Pol ϵ と入れ替わることが示された。この Pol ϵ -CTF18-RFC 複合体状態での PCNA ローディングは Pol ϵ の非 DNA 合成状態でみられたものであるが、Pol ϵ の DNA 合成中の状態を再現した状態に置くと抑えられることがわかった。さらに Pol ϵ の DNA 合成と CTF18-RFC による PCNA ローディングを連動させた場合、連動の起きない RFC による場合と比べて高い効率の DNA 合成が見られた。これらの結果から、Pol ϵ -CTF18-RFC 複合体では、Pol ϵ の DNA 合成モードを CTF18-RFC がモニターし、Pol ϵ の DNA 合成に障害が生じたタイミングで速やかに PCNA をローディングして DNA 合成を継続する仕組みがあることが

示された。

以上より CTF18-RFC は Pol ϵ と連動して PCNA をローディングし、効率の良い DNA 合成を促す特性からリーディング鎖の連続的な DNA 合成時に特化して機能する。これに対し RFC は特定の DNA ポリメラーゼとは連動せず、単独で新生 3'-プライマー末端に効率良く PCNA をローディングする。このような PCNA へは Pol δ が優先的に機能できるため、新生 3'-プライマー末端が継続的に作られるラギング鎖合成時には RFC と Pol δ が特化して機能すると考えられる。