

超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来の2種のDNA ポリメラーゼと複製関連タンパク質に関する研究

大門, 克哉

<https://hdl.handle.net/2324/2236306>

出版情報 : 九州大学, 2018, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* 由来の
2 種の DNA ポリメラーゼと複製関連
タンパク質に関する研究

大門 克哉

2019

目次

緒論	4
第一章	
1. DNA ポリメラーゼと 3 種の増殖細胞核抗原(PCNA)の相互作用	8
1.1 序論	8
1.2 材料と方法	9
1.2.1 材料及び機器	9
1.2.2 <i>A. pernix</i> の PCNA ホモログをコードする遺伝子のクローン化	9
1.2.3 各組換え ApePCNA の発現と精製	10
1.2.4 <i>A. pernix</i> 由来の組換え PolI 及び PolII の精製	11
1.2.5 DNA ポリメラーゼによる標識ヌクレオチドの取込み	12
1.2.6 プライマー伸長反応の分析	13
1.2.7 ウェスタンブロッティングと N 末端アミノ酸配列の解析	13
1.2.8 ApePCNA の免疫沈降法及びイムノブロッティング	13
1.2.9 ケミカルクロスリンク法	14
1.3 結果	14
1.3.1 <i>A. pernix</i> ゲノム中に存在する 3 種の PCNA ホモログの同定	14
1.3.2 組換え体 ApePCNA のクローン化、発現及び精製	14
1.3.3 <i>A. pernix</i> の細胞抽出液における PCNA の検出	15
1.3.4 DNA ポリメラーゼのプロセシビティに与える各 ApePCNA の効果	15
1.3.5 ApePCNA 間の相互作用について	16
1.3.6 各 ApePCNA の細胞中での分子量評価(クロスリンク試験)	17
1.4 考察	18
第二章	
2. DNA ポリメラーゼと複製因子 C(RFC)の相互作用	21
2.1 序論	21
2.2 材料と方法	21
2.2.1 材料及び機器	21
2.2.2 <i>A. pernix</i> の RFC ホモログをコードする遺伝子のクローン化	22
2.2.3 組換え体 ApeRFCS の発現と精製	22
2.2.4 組換え体 ApeRFC 複合体の発現と精製	23
2.2.5 ATPase 活性の測定	23
2.2.6 DNA ポリメラーゼによるヌクレオチドの取込み実験	24
2.2.7 プライマー伸長反応の分析	24
2.2.8 ウェスタンブロッティングと N 末端アミノ酸配列の解析	24
2.3 結果	25

2.3.1	<i>A. pernix</i> ゲノム中に存在する RFC ホモログの同定	25
2.3.2	組換え体 ApeRFCS 及び ApeRFC 複合体のクローン化、発現並びに精製	26
2.3.3	<i>A. pernix</i> の細胞抽出液における ApeRFCS の検出	26
2.3.4	ApeRFCS 及び ApeRFC 複合体の ATPase 活性の測定	26
2.3.5	ApePolII 及び ApePolIII の PCNA 依存的 DNA 合成への ApeRFC の影響	27
2.4	考察	28
第三章		
3.	2 種の DNA ポリメラーゼ PolB1、PolB3 のコード領域の再検討	30
3.1	序論	30
3.2	材料と方法	31
3.2.1	シーケンス解析	31
3.2.2	<i>A. pernix</i> の DNA ポリメラーゼ遺伝子のクローン化	31
3.2.3	組換えタンパク質の調製	31
3.2.4	ウエスタンブロットティング	32
3.2.5	ヌクレオチド取込みアッセイ	32
3.2.6	PCR	32
3.2.7	エキソヌクレアーゼアッセイ	33
3.3	結果	33
3.3.1	ApePolB1 及び ApePolB3 のオープンリーディングフレームについて	33
3.3.2	<i>A. pernix</i> 細胞抽出液中の Native PolB1 及び PolB3 の同定	34
3.3.3	予測された ORF 由来の組換えタンパク質の精製	34
3.3.4	比活性の比較	34
3.3.5	耐熱性の比較	35
3.3.6	耐塩性について	35
3.3.7	PolB3L の PCR 性能	35
3.3.8	PolB3L のエキソヌクレアーゼ活性	35
3.4	考察	36
結論		38
謝辞		40
引用文献		41
図表		49

緒論

生物が細胞の増殖や個体と種の維持を行っていくためには、その遺伝情報としてゲノム DNA を複製し、伝達していく必要がある。そのためには、忠実なゲノム DNA の複製及びその厳密な制御が不可欠であると言える。DNA 複製の不調や制御機構の破綻は、直ちに遺伝子の変化や細胞死、または癌化などにつながる異常増殖を引き起こす。よって、これらの DNA 複製機構及びそれと連動する DNA 組換えや修復といった現象並びに、それに関わる因子の機能や構造を分子レベルで解析することは、単に研究の領域にとどまらず、種々のがん関連疾患や各種遺伝病の病理的解明につながり、これらの発症の予防や治療に対する技術の開発において非常に重要である。このような分子生物学的研究は、生物学的にその構成が比較的より単純な原核生物で始まり、その基本的機構が解明されて、遺伝情報の維持と伝達に関わる多くの生命現象が理解されている。一方、より高度な形態を持つ真核生物では、その要素因子の多さや多様性等により、詳細な理解はより困難であるが、ヒトの生命現象を理解するために、多くの研究者が精力的に研究を続けている。地球上の生物として、バクテリア(真正細菌、Bacteria)、真核生物(Eukarya)と並んで、アーキア(Archaea)が存在し、この 3 つの生物ドメインから構成されていることが広く知られるようになった。アーキアの研究は、他のドメインに比べてその歴史は浅く、不明な部分がより大きい、地球上の生命の起原やその進化を理解するためにも、3 ドメインの生命現象の理解が不可欠である。著者はアーキアに注目し、その中でも高温下を好んで生息する超好熱性アーキアを用いて研究を進めた。

第 3 の生物ドメインを構成するアーキアは原核生物であり、その細胞の形態においてはバクテリアと似た構造を持っている(Olsen and Woese, 1997、Woese and Fox, 1977)。細菌と同じように環状のゲノム構造をとっており、そのサイズもバクテリアと類似しているが、アーキアの中でも超好熱アーキアは、約 200 万塩基対と顕著に小さく(大腸菌が約 480 万塩基対、枯草菌が約 420 万塩基対)、コードされている遺伝子数も 2000~3000 個と少ない(Bult et al., 1996)。その一方で、アーキアは DNA 複製、修復、転写等の遺伝情報伝達系を動かすタンパク質分子のアミノ酸配列が、明らかに真核生物のものに類似しており、両者が共通の祖先から進化したことを推測させる(Edgell and Doolittle, 1997)。従ってアーキアの遺伝情報伝達に関わる生命現象の分子機構を理解することによって、より複雑に進化した真核生物の生命現象の機構を詳細に理解できるのではないかと期待される。すなわち、アーキアは真核生物の遺伝情報維持と伝達に関する分子機構を研究する優れたモデルになる。また超好熱性アーキアのタンパク質はよりコンパクトに折りたたまれ、熱安定性が高くプロテアーゼによる分解を受けにくい等の特徴のため、生化学的に取り扱いが容易で、*in vitro*での機能解析や、電子顕微鏡観察、X 線結晶解析等の構造解析研究において非常に有利である。本研究では、クレンアーキオタ(crenarchaeota)に属する超好熱性アーキア *Aeropyrum pernix* を用い、DNA 複製の分子機構の中で、DNA ポリメラーゼ及び DNA ポリメラーゼと相互作用して DNA 鎖の伸長に関わるタンパク質の機能解析について検討した。

好熱菌の中でも至適増殖温度が 90℃以上の菌は超好熱菌と呼ばれる。*A. pernix* は、トカラ列島に位置する小宝島付近の浅海熱水噴出孔から分離された海洋性超好熱アーキアである(Sako et al., 1996)。この単離までは、超好熱菌の多くが嫌気性のアーキアであったが、*A. pernix* は好気性の超好熱菌である。本種は至適増殖温度が 90~95℃の従属栄養性で、菌体内外に超好熱性のセリン

ロテアーゼを生産し、H₂S を生産せず、TCA 回路を有し末端酸化酵素としてシトクロム a を利用する (Sako et al., 1997, Croocker et al., 1999)。また本菌は偏性好気性超好熱菌であることから注目を受け、比較的早い時期に全ゲノム解析に着手されて、その塩基配列が発表され (Kawarabayasi et al., 1999)、そのゲノムサイズは約 167 万塩基対と顕著に小さい。発表時のオープンリーディングフレーム (以下 ORF) の数は約 2700 とされていたが、その後の再検討により、1871 の ORF を含むとされた (Natale et al., 2000)。以降も使用される開始コドンに着目した見直し等が行われ、その結果 ORF が 1610 存在すると報告されている (Guo et al., 2004)。

DNA ポリメラーゼはテンプレートとなる DNA 配列上で、プライマーの 3'末端の OH 基と、次の配列となる塩基を有するヌクレオチドの α -リン酸との間で、ホスホジエステル結合の形成反応を触媒する。1956 年に *Escherichia coli* の DNA ポリメラーゼ I が最初に見いだされてから、数多くの DNA ポリメラーゼが報告されてきた (Bessman et al., 1956)。今日、DNA ポリメラーゼはそのアミノ酸配列の相同性から、A、B、C、D、E、X 及び Y の 7 種に分類されている (Braithwaite and Ito, 1993, Cann and Ishino, 1999, Lipps et al., 2003, Ohmori et al., 2001)。DNA 鎖中にデオキシモノヌクレオチドを取り込む活性は、DNA ポリメラーゼ全般に保存されている。一方、プロセシビティ (processivity、連続性)、フィデリティ (fidelity、正確性) そして基質となるヌクレオチドの選択性等の特異性については、ファミリーごとにかなり異なっているところもある (Ishino and Ishino, 2013)。*E. coli* は 5 種のポリメラーゼを持ち、Pol I、II 及び III がそれぞれファミリー A、B 及び C に相当する。また Pol IV 及び Pol V は、その多くがトランスリージョン合成 (Translesion synthesis, TLS) 活性を含むファミリー Y に分類される。真正細菌の Pol III と、真核生物の Pol α 、 δ 及び ϵ はいずれも複製過程において必須な酵素であり、それぞれファミリー C 及び B に含まれる。真核生物の TLS 酵素である Pol η 、 ι 、及び κ は、やはりファミリー Y に位置づけられる。

DNA の複製を受け持つ DNA ポリメラーゼは、自身単独ではそれほど長いヌクレオチド鎖を合成できず、鋳型鎖から滑り落ちやすい。そのため DNA 鎖合成のプロセシビティの向上には、DNA ポリメラーゼを DNA 上に留めておくためのスライディングクランプ (以下クランプと示す) と、ATP 依存的にクランプを DNA 上に導くクランプローダーと呼ばれる分子が細胞内では機能していることがわかっている (Waga and Stillman, 1998)。ファージから真核生物にいたるまで、クランプは異なるサブユニット構成と低いアミノ酸配列の相同性にも関わらず、いずれも 6 個の相同なドメインからなる平面状リング構造を形成する。バクテリアでは 2 量体の Pol III β サブユニット (Kong et al., 1992)、またヒトや酵母等では PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen、増殖細胞核抗原) が 3 量体を形成し、それぞれクランプとして機能している (Krishna et al., 1994)。全ての真核生物中に PCNA をコードする遺伝子があること及び生存に必須なタンパク質であることが分かっている。それは、DNA 合成や代謝のプロセス内で、PCNA が他の多くの酵素等と相互作用することにより、それらの活性に対し多様な役割を担っていることから明らかである。アーキアにおいても、そのゲノム DNA 配列が明らかになって以降、真核生物の PCNA のホモログと見られる遺伝子が少なくとも 1 つは含まれることが知られている。クランプという名の通り PCNA は基本的に全て、2 本鎖 DNA を囲む形のリング構造をとり、DNA 上を双方向的に自由に移動することで、複製に関する DNA ポリメラーゼの伸長促進因子 (Processivity factor) として機能する。PCNA も β クランプも、リング内部に多くの塩基性アミノ酸残基を持ち、正電荷に富んだ表面を形成して分子の中心に通った 2 本鎖 DNA 上を自在に滑るように移動できる。プライマーゼによって合成されたプライマーに PCNA が結合し、ポリメラーゼを DNA 鋳型中にロードさせ、その後の連続的な DNA 合成を開始、継続できる。これまでの研究により、真核生物の PCNA には

DNA ポリメラーゼのみではなく、数多くの因子が結合し、PCNA を足場として様々な反応がおこなわれることが分かっている。主なものだけでも、ラギング鎖の連結、複製エラーの修復、DNA 修飾、クロマチンの再構築等があり、約 50 種類の PCNA 結合タンパク質が同定されている (Moldovan et al., 2003, Vivona and Kelman, 2007)。

様々な生物のクランプローダーは、類似した形態を持つサブユニットの 5 量体として存在することが知られ、ATP の加水分解に依存して鋳型 DNA 上のプライマーの 3' 末端を認識し、クランプと結合して開環させ、鋳型 DNA へクランプをはめ込む役割を持つ (O'Donnell et al., 2001)。大腸菌においては、クランプローダーである γ 複合体 (δ' , γ_3 , δ) の結晶構造が解かれ (Jeruzalmi et al., 2001a)、同時に δ サブユニット: β 単量体の 1:1 複合体の結晶構造も決定し (Jeruzalmi, D. et al., 2001b)、これまでに蓄積された機能解析の結果を説明できる γ 複合体による β クランプの開環機構が提唱された。一方真核生物のクランプローダーである RFC (Replication Factor C、複製因子 C) は 1 分子の大サブユニット (RFC1) と、異なる 4 分子の小サブユニット (RFC2~5) からなるヘテロ 5 量体を形成する。酵母においては、その構造モデルが既に解明されている (Bowman et al., 2005)。

アーキアのゲノム配列解析の結果から、ゲノム DNA 中に PCNA や RFC に類似したタンパク質をコードする遺伝子が存在することが明らかとなった。超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* の PCNA (PfuPCNA) が、*P. furiosus* 由来の DNA ポリメラーゼの DNA 鎖合成活性を促進することが示された (Cann et al., 1999b)。そしてこの PfuPCNA の結晶構造は、先に報告されていたヒト PCNA と分子レベルで高い相同性を持っていた (Matsumiya et al., 2001)。

また *P. furiosus* 由来の RFC (PfuRFC) は、生化学的な解析により、真核生物のものと同様に PfuRFCL (大サブユニット: 分子量約 55000) と PfuRFCS (小サブユニット: 分子量約 37000) が 1:4 の化学量論比で機能的な複合体を形成し、PfuPCNA を DNA 鎖上にロードする機能を持っていた (Cann et al., 2001)。さらに PfuRFCL の C 末端側に存在する PIP (PCNA-interacting peptide) ボックスとの原子レベルでの相互作用という点についても、真核生物由来の PCNA と非常によく似ていることが明らかにされた (Matsumiya et al., 2002)。加えて PfuPCNA が仔牛胸腺由来の DNA ポリメラーゼの DNA 鎖合成活性を促進したことから、アーキアの PCNA が他の哺乳類の複製因子と機能的に相互作用できることが示された (Ishino et al., 2001)。その後、アーキアの PCNA と RFC に関しては多くの論文が発表されている (Kelch et al., 2012)。

本研究において第一章では、クレンアーキオタに属するアーキア *A. pernix* の PCNA (ApePCNA) をコードすると推定される 3 種の遺伝子をクローン化し、大腸菌中で発現させ精製することでタンパク質を単離した。そして *A. pernix* 由来の 2 種のファミリー B DNA ポリメラーゼである、ApePolB1、ApePolB3 との相互作用について解析した。第二章においては、*A. pernix* ゲノム中に存在する RFC の小サブユニット及び大サブユニットのホモログと推定される 2 種の遺伝子をクローン化、大腸菌での発現及び精製、そして、2 種の DNA ポリメラーゼ及び 3 種の ApePCNA との相互作用について解析した。その結果、これらのタンパク質が実際にクランプ、クランプローダーとして機能することが分かった。さらに、第三章においては、ApePolB1 及び ApePolB3 について、これまでの研究やデータベース上のアノテーションから予測されるコード領域を見直し、翻訳開始コドンとして機能しうるトリプレットから翻訳される構造遺伝子を複数クローニングして、細胞内での ApePolB1 及び ApePolB3 に対する正確な翻訳開始位置を特定した。その結果、*A. pernix* 細胞内においては、これまで解析されてきた ApePolB1 や ApePolB3 よりも大きいタンパク質がそれぞれの酵素タンパク質として産生されていることが分かった。これらのタンパク質を精製して、それぞれ酵素活性を調べた。特に ApePolB3 は N

末端領域が伸びたことによって、*in vitro* における熱安定性が顕著に向上した。この PolB3 の安定性は Polymerase Chain Reaction (PCR) に利用するのに十分なものであり、さらに顕著に塩耐性が強いことから、有用 PCR 酵素としての性質を有していることが分かった。

第一章

1. DNA ポリメラーゼと 3 種の増殖細胞核抗原(PCNA)の相互作用

1.1 序論

PCNA は最初、全身性エリテマトーデス患者の抗原として発見された。細胞周期の S 期に合成されることが知られており、分裂中の細胞核の中に多く存在していることから、増殖細胞核抗原と呼ばれることとなった。PCNA(クランプ)の主要な働きは、DNA 複製におけるポリメラーゼの活性促進であり、真核生物の細胞内において数多くの DNA 代謝工程に関与することが知られている。真核生物の複製フォークでは、主に DNA ポリメラーゼ α (Pol α)、DNA ポリメラーゼ δ (Pol δ) 及び DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ) の 3 種類の DNA ポリメラーゼが共働しており、このうち Pol δ は PCNA に対する依存度が最も高い。また Pol ϵ についても活性の促進が見られる。

PCNA は、Fig.1-1 に示したようなホモ 3 量体の形で 2 本鎖 DNA のまわりにドーナツ型の環状構造を形成することにより、DNA 鎖上に DNA ポリメラーゼをつなぎとめておく働きを持つ。真核生物の DNA 複製工程においては、ATP 依存的に PCNA リングを開裂させてこのリングを効率良く DNA 鎖上にのせるクランプローダー分子として RFC が必要である。PCNA が DNA 鎖上にローディングされた後、DNA ポリメラーゼが PCNA と結合し、DNA 鎖上でプロセッシングな DNA 複製を可能とするホロ酵素複合体を形成すると考えられる。

第 3 の生物であるアーキアの注目すべき特徴として、DNA 複製などの遺伝情報維持と伝達機構に関わる各種タンパク質は、バクテリアのものとはまったく異なり、むしろ真核生物のタンパク質とより類似している。アーキアと真核生物との DNA 複製における相似性は、好塩性アーキアの生育が、真核生物の Pol α 様 DNA ポリメラーゼ(ファミリーB)の特異的阻害剤であるアフィジコリン(aphidicolin)によって抑制されることが報告された時に(Forterre et al., 1984, Schinzel and Burger., 1984) 予想されていた。

アーキアが実際に真核生物の Pol α 様 DNA ポリメラーゼを有していることを示す結果は、アメリカ、イタリア、そして我々の研究グループから 3 種の異なる超好熱性アーキアを用いた独立の実験で相次いで証明された(Perler et al., 1992, Pisani et al., 1992, Uemori et al., 1993)。さらに興味深いことに、1 つのアーキア細胞が 2 種の異なる Pol α 様 DNA ポリメラーゼを有していることが、我々の研究グループによって発見され(Uemori et al., 1995)、アーキアが真核生物と同様に、複数の Pol α 様 DNA ポリメラーゼによって、自らのゲノム DNA を複製している可能性を示す結果として注目された。アーキア細胞における複数種の Pol α 様 DNA ポリメラーゼの存在はその後、クレンアーキオタに属する超好熱菌の *A. pernix* からも報告された(Cann et al., 1998)。ゲノム解析時代に入り、ゲノム中の配列から DNA ポリメラーゼ遺伝子の存在を予想するようになると、アーキアにおける DNA ポリメラーゼの分布は、アーキアの門によって異なり、クレンアーキオタ門に属するアーキアは複数の Pol α 様 DNA ポリメラーゼを有していることが特徴の 1 つになっている(Edgell et al., 1997)。アーキアの他の門は 1 種類の Pol α 様 DNA ポリメラーゼとは別に、ヘテロ 2 量体からなる DNA ポリメラーゼが見つかった。このポリメラーゼは、DP1 と呼ばれる小サブユニットと DP2 と呼ばれる大サブユニットから成っており、DP1 サブユニットは、真核生物の Pol α 、 δ 及び ϵ の第 2 サブユニットと配列的に相同性を持っている

が、DP2は、他の DNA ポリメラーゼとの配列相同性を有していないアーキア独自のタンパク質である。このヘテロ 2 量体からなる酵素は、ファミリー D 型 DNA ポリメラーゼと名づけられた (Uemori et al., 1997)。

一般的に、DNA 複製を担う主要 DNA ポリメラーゼは、プロセスビティを上げるためにクランプ分子を必要とする。大腸菌や真核細胞での報告から、クランプ分子は 1 種類と考えられた。アーキアで最初に見つかった PCNA もそれが唯一であると考えられた。その後、1 つの生物種が 2 種類の PCNA を有するという報告が出た。我々はゲノム配列が解読された *A. pernix* のゲノム中に PCNA 様配列をコードする遺伝子が 3 種類存在することに注目し、それぞれの遺伝子をクローニングして、組換えタンパク質として 3 種の遺伝子産物を調製した。本章では、これら 3 種のタンパク質について、その生化学的性質の解析及び *A. pernix* 中に見つかった 2 種の Polα 様 DNA ポリメラーゼ (ApePolI 及び ApePolII) と相互作用することを確かめた。3 種の PCNA ホモログのうち ApePCNA2 と名づけられたものについては、ゲノム配列情報から予想される翻訳開始コドン候補が 2 種類存在したので、2 種類のものをクローン化・精製し、それぞれについて PCNA2 の候補タンパク質として評価した。2 種の違いは、N 末端側 16 アミノ酸の有無である。

1.2 材料と方法

1.2.1 材料及び機器

本実験において使用した試薬等については、特に表記しない限り試薬特級または分子生物学研究用グレードのものを使用した。またタンパク質材料を精製・純化するために使用した HiTrap カラム等のクロマトグラフィー用の担体については、特に示さない限り GE Healthcare 社製のものを用了。カラムクロマトグラフィーを実施する際、送液システムとして AKTA Explorer 10S (GE Healthcare 社製) を使用した。DNA の抽出及び精製に関しては、挿入 DNA のチェックのための粗抽出に抽出機器 PI-50 (クラボウ社製) とその専用試薬を、クローニング及び高純度の精製用には、GFX Micro Plasmid Prep キット (GE Healthcare 社製) を使用した。また制限酵素でプラスミドベクターから切り出した DNA 断片の精製には、MinElute Gel Extraction キット (Qiagen 社製) を用いアガロースゲルより回収した。制限酵素については、東洋紡社製、タカラバイオ社製または New England BioLabs 社製のいずれから選択して使用した。その他各工程において用いた試薬類についてはその都度記載した。その際各種試薬キット類は、基本的にキットに添付された取り扱い説明書に従って使用した。その他分析用の機器などについても同様に操作し、結果を得た。

1.2.2 *A. pernix* の PCNA ホモログをコードする遺伝子のクローン化

PCNA ホモログをコードする遺伝子を *A. pernix* ゲノム DNA から PCR によって増幅した。まず、ゲノム配列から予測された 3 種の PCNA ホモログをクローン化する目的で、以下の 6 種類の PCR プライマーをデザインした。ここで、NdeI 及び HindIII または BamHI の制限酵素切断部位が、各プライマー配列中に含まれるように構成した (下線部分)。

ApePC1F: 5'-GCGAACATAT GTCCTCTGAG GCCACCCTA-3'

ApePC1R: 5'-CGCTTAAGCT TACTAACCTG TCGAGG-3'

ApePC2F: 5'-GCGAACATAT GGTCGCCTCT ATCGAG-3'

ApePC2R: 5'-CATATGGATC CTTACTACTC GATCTTC-3'

ApePC3F: 5'-GCGAACATAT GTTCAGACTA GTATAG-3'

ApePC3R: 5'-CATATGGATC CTTACTAGCC AGCTAG-3'

PCR の条件は、鋳型となる *A. pernix* の DNA を十分変性させるため 94℃ で 2 分加熱した後、94℃ で 30 秒変性、55℃ で 30 秒アニール、そして 72℃ で 30 秒伸長反応を 25 サイクル実施した。サイクル終了後、増幅産物の伸長を完了させる目的で、72℃ で 5 分さらに加熱した。増幅をより正確に行うため、校正機能を付随した PfuDNA ポリメラーゼ(研究室で調製)を使用した。PCR 増幅産物を、T4DNA リガーゼを用いて TA クローニングベクター (pT7Blue:Novagen 社製または、pGEM-T easy: Promega 社製) に連結させ、得られたプラスミドベクターを用いて *E. coli* JM109 株のコンピテントセル(研究室で調製)を形質転換した。生育したいくつかの独立クローンを培養してプラスミドを抽出し、その中に挿入された DNA のヌクレオチド配列を、キャピラリーシーケンサー (ABI Prism 310 Genetic Analyzer: Applied Biosystems 社製)を用いて決定した。そして *A. pernix* の PCNA と見られる遺伝子を、NdeI 及び HindIII 又は BamHI によって切り出し、この DNA 断片を、あらかじめ同じ制限酵素で処理した pET21a ベクター (Novagen 社製) 中に Ligation High (東洋紡社製)を用いて連結した。このプラスミドを用いて再度 *E. coli* を形質転換し、独立クローンからプラスミド DNA を調製した。こうして構築したプラスミドを、それぞれ pAP-PCNA1、pAP-PCNA2S 及び pAP-PCNA3 とした。

ApePCNA2S については N 末端側のアミノ酸が欠失している、いわゆるトランケート型である可能性が考えられたため、開始メチオニンのコドンと予想した ATG の付近を精査して、48 塩基対上流に TTG コドンが存在することを見つけ、そこからこの ApePCNA2 のオープンリーディングフレームが始まっていることを予測した。そのため、N 末端側に以下に示した新規な PCR プライマーを設計して *A. pernix* ゲノムからの遺伝子増幅を実施した。ここで、NdeI 及び BamHI の制限酵素切断部位が、各プライマー配列中に含まれている(下線部分)。

ApePC2S: 5'-GCGAACATAT GTTTAGATAC GAGGCT-3'

ApePC2R: 5'-CATATGGATC CTTACTACTC GATCTTC-3'

PCR は、PfuDNA ポリメラーゼを使用し、上記と同様の温度プロファイルで 25 サイクル実施した。得られた PCR 増幅産物を pGEM-T Easy 中に組み込み、上記した 3 種のプラスミドと同様に形質転換に用いた。得られた形質転換体からプラスミド DNA を抽出し、その中に挿入された DNA のヌクレオチド配列を、キャピラリーシーケンサーを用いて数種の独立クローンについて決定した。N 末端側を延長した *A. pernix* の PCNA2 と見られる遺伝子を、NdeI 及び BamHI によって切り出し、この DNA 断片を、あらかじめ同じ制限酵素で処理した pET21a ベクター中に Ligation High を用いて連結した。こうして構築したプラスミドを、pAP-PCNA2L とした。

1.2.3 各組換え ApePCNA の発現と精製

各 PCNA をコードしたプラスミド pAP-PCNA1、pAP-PCNA2S、pAP-PCNA2L 及び pAP-PCNA3 を用い、*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株 (Stratagene 社製) を形質転換した。得られたトランスフォーマントの株を、100 µg/mL のアンピシリン (Ampicillin) 及び 20 ng/mL のクロラムフェニコール (Chloramphenicol) を含む 1 L の Luria-Bertani 培地中で、OD 600nm の値が 0.5 になるまで 37℃ で培養した。イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (Isopropyl-β-D-thiogalactoside、IPTG) を最終濃度 1.0 mmol/L になるように加え、さらに 37℃ で 5 時間培養を続けた。

菌体を遠心分離操作によって回収し、緩衝液 A (50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 0.1 mmol/L EDTA; 0.5 mmol/L ジチオスレイトール; 10% グリセロール) 25 mL に懸濁した後、超音波により菌体を破碎

した。菌体残渣を4℃において30000 × gで15分遠心分離することで除き、次に大腸菌由来のタンパク質を、75℃で15分加熱して変性させ、遠心分離によって上清画分を集めた。この溶液から核酸を除去する目的で、ポリエチレンイミン (Polyethyleneimine)を含むPEI溶液(最終濃度0.2%のポリエチレンイミン及び0.5 mol/LのNaClを含む)を加え、さらに4℃において30分スターラーで攪拌した。上清30 mL中のタンパク質に対し、硫酸アンモニウム粉末16.8 gを加えて塩析した(80%飽和濃度)。これを遠心分離して得られた沈殿画分を緩衝液B(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 0.1 mmol/L EDTA; 0.5 mmol/L ジチオスレイトール; 10% グリセロール; 0.1 mol/L NaCl)に溶解し、この緩衝液Bに対して透析した。

このようにして得られた透析内液を、高圧液体クロマトグラフィーシステム(AKTA explorer 10S; GE Healthcare社製)を用いて、陰イオン交換カラム(HiTrap Q; 5 mL 容量)にアプライした。クロマトグラフィーによる展開は、流速2 mL/minでBuffer-A中に0.1~1.0 mol/LのNaCl溶液を含む50 mLの直線グラジエントで行った。ApePCNA1とApePCNA3は、0.4~0.6 mol/Lの濃度範囲で溶出された。またApePCNA2Lは0.4~0.55 mol/Lの範囲で溶出された。陰イオン交換カラムの後、PCNAを含む画分を集めて緩衝液Aに懸濁し、アフィニティーカラム(HiTrap heparin; 1 mL 容量)にアプライした。展開は流速1 mL/minで、緩衝液A中に0.1~1.0 mol/LのNaClを含む直線グラジエントで実施した。ApePCNA1とApePCNA3は、それぞれ0.25 mol/L及び0.6 mol/Lの塩濃度で溶出された。またApePCNA2Lは0.5~0.7 mol/Lの範囲で溶出された。このようにして純化されたApePCNA1、ApePCNA2L及びApePCNA3は、緩衝液Aに対して透析した後、50%濃度のグリセロールを含むストック溶液として-20℃で保存した。

またApePCNA2Sの精製においては、上記と同様の工程で培養、集菌後、超音波処理した上清溶液を加熱処理せず、4℃で攪拌しながらPEI溶液を少しずつ加え、さらに30分攪拌した。上清溶液を疎水性カラム(HiTrap Phenyl-Sepharose HP; 1 mL 容量)にアプライし、流速2 mL/minで1.5~0 mol/LのNaClを含む20 mLの直線グラジエントで展開した。PCNAが溶出した画分をすべて集め、次に陰イオン交換カラム(HiTrap Q; 5 mL 容量)にアプライした。クロマトグラフィーによる展開は、流速2 mL/minでBuffer-A中に0.1~1.0 mol/LのNaCl溶液を含む50 mLの直線グラジエントで行った。ApePCNA2Sは、0.6~0.7 mol/Lの濃度範囲に溶出された。陰イオン交換カラムの後、PCNAを含む画分を集めて緩衝液Aにより希釈し、アフィニティーカラム(HiTrap heparin; 1 mL 容量)にアプライした。展開は流速1 mL/minで、Buffer-A中に0.1~1.0 mol/LのNaClを含む直線グラジエントで実施した。ApePCNA2Sは、0.3 mol/Lの塩濃度で溶出された。純化されたApePCNA2Sは緩衝液Aに対して透析した後、50%濃度のグリセロールを含むストック溶液として-20℃で保存した。

1.2.4 *A. pernix* 由来の組換え PolI 及び PolII の精製

A. pernix の2種のDNAポリメラーゼであるApePolI及びApePolIIは、以前に示された方法(Cann et al., 1999a)に基づいて行い、若干の修正を加えた。ApePolI用の発現プラスミドpAPP1及びApePolII用のプラスミドpAPP2で*E. coli* CodonPlus-RIL(Stratagene社製)を形質転換した。アンピシリン(100 µg/mL)及びクロラムフェニコール(20 ng/mL)を含むLuria-Bertani培地中で、形質転換した細胞を37℃の温度で5時間培養することにより、これら2種のポリメラーゼを発現させた。

この培養液1 Lを5000 × gで20分遠心することにより菌体を沈澱として回収した。この沈澱を緩衝液A 30 mLに懸濁し、超音波処理により菌体を破碎した。菌体破碎物を30000 × gで20分遠心分離し、得られた上清溶液を75℃で15分加熱して大腸菌由来のタンパク質を変性、沈澱させた。この

溶液を遠心分離して上清を集め、4℃で攪拌しながら PEI 溶液(最終濃度 0.1%のポリエチレンジアミン及び 0.5 mol/L の NaCl を含む)を少しずつ加え、さらに 30 分攪拌した。上清溶液 30 mL に対し硫酸アンモニウム粉末 16.8 g を少しずつ加え、80%飽和溶液とした。塩析されたタンパク質を緩衝液 B に溶解し、この緩衝液に対して透析した。

ApePolI を含む透析内液を、陰イオン交換カラム(HiTrap Q; 5 mL 容量)にアプライした。クロマトグラフィーによる展開は、流速 2 mL/min で緩衝液 A 中に 0.1~1.0 mol/L の NaCl 溶液を含む 50 mL の直線グラジエントで行った。ApePolI は 0.2~0.3 mol/L の濃度範囲に溶出された。次に ApePolI を含む画分を集めて緩衝液 A により希釈し、アフィニティークラム(HiTrap heparin; 1 mL)にアプライした。展開は流速 1 mL/min で、緩衝液 A 中に 0.1~1.0 mol/L の NaCl を含む直線グラジエントで実施した。ApePolI は、0.45~0.55 mol/L の塩濃度で溶出された。

また ApePolII の精製においては、硫酸塩析までは ApePolI と同様にして実施し、その次に ApePolIII を含む透析内液を陽イオン交換カラム(HiTrap SP; 5 mL 容量)にアプライした。クロマトグラフィーによる展開は、流速 2 mL/min で緩衝液 A 中に 0.1~1.0 mol/L の NaCl 溶液を含む 50 mL の直線グラジエントで行った。ApePolIII は 0.2~0.25 mol/L の濃度範囲に溶出された。次に、この ApePolIII を含む画分を集めて緩衝液 A により希釈し、アフィニティークラム(HiTrap heparin; 1 mL 容量)にアプライした。展開は流速 1 mL/min で、緩衝液 A 中に 0.1~1.0 mol/L の NaCl を含む直線グラジエントで実施した。ApePolIII は、0.25~0.35 mol/L の塩濃度で溶出された。このようにして精製された ApePolI 及び ApePolIII は、50%濃度のグリセロールストック溶液として、-20℃で保存した。

1.2.5 DNA ポリメラーゼによる標識ヌクレオチドの取込み

ApePolI 及び ApePolIII のヌクレオチド取込み活性は、ApePCNA1、ApePCNA2 及び ApePCNA3 の存在下及び非存在下で実施した。その際、環状 M13 1 本鎖 DNA (タカラバイオ社製) 及び直鎖状 M13 1 本鎖 DNA を使用した。ポリメラーゼ反応のプライマーとして、M13mp18DNA の 6204 位置から 6233 位置に相補的な 30 塩基長のオリゴマーである、5'- ATTCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCCTG -3'を環状並びに直鎖上 DNA にアニールさせた(Yanisch-Perron et al., 1985)。直鎖上 M13 1 本鎖 DNA の調製に際しては、まず 6260 位置から 6289 位置(この配列中にマルチクローニングサイトを含む)に、次の配列を持ったオリゴヌクレオチド 5'- GCCAAGCTTG CATGCCTGCA GGTCGACTCT -3'をアニールさせ、制限酵素切断部位を持った 2 本鎖領域を形成させた。次にこの DNA を制限酵素 PstI(下線部分)で切断し、エタノール沈殿を行うことで精製した。

ヌクレオチド取込みアッセイについては以下に詳細を示した。テンプレートへのプライマーのアニールは、DNA ポリメラーゼ用反応緩衝液中で、テストあたり M13 1 本鎖 DNA 0.1 µg 及び 1.0 pmol のプライマーを使用し、3 分間煮沸させた後、徐々に室温まで温度を下げることで行った。ここに 0.5 pmol の DNA ポリメラーゼを添加した。この混合液から 20 µL を取り、各 ApePCNA の存在下及び非存在下で DNA ポリメラーゼ反応を実施した。反応の開始に当たっては、227 nmol/L の(メチル-³H) TTP (Amersham 社製)を含む、0.1 mmol/L 濃度のデオキシリボヌクレオチド三リン酸を加えた。反応液は、25 µL 液中に、20 mmol/L 濃度の Tris-HCl, pH 8.8、5.0 mmol/L の MgCl₂ 及び 2.0 mmol/L の 2-メルカプトエタノールという構成で実施した。各ポリメラーゼ反応は、ApePolI では 70℃で 5 分間、ApePolIII では 70℃で 20 分間実施した。反応終了後、混合液のうち 20 µL をとり、DE81 フィルター(Whatmann 社製)上にスポットした。このフィルターを 5%濃度の Na₂HPO₄ 溶液で 3 回洗浄し、DNA 鎖中に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

1.2.6 プライマー伸長反応の分析

ApePCNA1、ApePCNA2 及び ApePCNA3 の存在下または非存在下で、直鎖状または環状の 2 種類の鋳型 DNA を用いて、ApePolI 並びに ApePolII によるプライマー伸長活性を測定した。具体的には、M13mp18DNA の 6177 から 6206 の位置に相補的な配列を持ち、 ^{32}P でその 5'末端をラベルされた 30 塩基長のプライマー 5'-CTGTGTGAAA TTGTTATCCG CTCACAATTC-3'を、2 種類の M13DNA にアニールさせた。テンプレートへのプライマーのアニールは、DNA ポリメラーゼ用反応緩衝液中で、テストあたり 0.1 μg の M13 1 本鎖 DNA 及び 1.0 pmol の ^{32}P でラベルされたプライマーを使用し、これらの混合液を 3 分間煮沸させた後、徐々に室温まで温度を下げることで下げることで行った。ここに 0.5 pmol 相当の DNA ポリメラーゼを添加した。この混合液から 7.0 μL を取り、各 ApePCNA の存在下及び非存在下で DNA ポリメラーゼ反応を実施した。反応は、0.2 mmol/L 濃度のデオキシリボヌクレオチド三リン酸を加えることで開始した。反応液組成は、10.0 μL 反応液中に、20 mmol/L 濃度の Tris-HCl, pH 8.8 及び 5.0 mmol/L の MgCl_2 を含む構成とした。各ポリメラーゼ反応は、ApePolI では 70°C で 5 分間、ApePolII では 70°C で 20 分間実施した。反応終了後、停止液 (98% 脱イオン化ホルムアミド、1.0 mmol/L 濃度の EDTA、0.1% キシレンシアノール及び 0.1% ブロモフェノールブルー) 3.0 μL を加え、このうち 2.6 μL をとり、50 mmol/L 濃度の NaOH 及び 1.0 mmol/L 濃度の EDTA 溶液中で、1.0% 濃度のアルカリアガロースゲル電気泳動を行うことで解析した。

1.2.7 ウェスタンブロッティングと N 末端アミノ酸配列の解析

以前に述べられた方法 (Sako et al., 1996) に基づき、*A. pernix* K1 株を培養した。培養後遠心分離により集菌し緩衝液 A 中に懸濁した 10 g 分の菌体をフレンチプレスにより破碎し、25000 $\times g$ で 15 分間遠心分離することで、上清溶液を回収した。イムノブロット分析のために、この溶液を 10% 濃度の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に用い、さらに Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Sequi-Blot PVDF, 0.2 μm ; Bio-Rad 社製) 上にエレクトロブロットした。ブロットした PVDF 膜のブロッキングは、0.1% (容量/容量) の Tween-20 を含む PBS 緩衝液 (以下 PBS-T) に 5.0% (重量/容量) のスキムミルク (和光純薬社製) を加えた溶液中で 1 時間行った。ブロックした PVDF 膜に、1000 倍に希釈したウサギ由来の抗 PCNA (-1、-2 及び 3) 血清を加えた PBS-T 溶液中で、1 時間室温で反応させた。PBS-T 溶液で 2 回洗浄した後、PBS-T 中で 10000 倍に希釈した西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼと抗ウサギイムノグロブリン G のコンジュゲートを、室温で 1 時間反応させた。PVDF 膜を PBS-T 溶液で 2 回洗浄した後、ケミルミネッセンスウェスタンブロット分析システム (アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いて、二次抗体のシグナルを検出した。

精製した ApePCNA の N 末端アミノ酸配列を確認するため、各 ApePCNA 溶液を 10% 濃度のポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、PVDF 膜上にエレクトロブロットした。次いでこの膜を 0.2% 濃度のクマシーブリリアントブルー (Coomassie brilliant blue, CBB) R250 染色液 (40% メタノール溶液) で染色し、5% メタノール溶液で脱色した。染色されたタンパク質のバンドに相当する部分を切り出し、50% メタノール溶液で 3 回洗浄した。洗浄した膜を十分乾燥させた後、自動エドマン分解によるアミノ酸シーケンサー (Protein sequencer model 492; Applied Biosystems 社製) で分析した。

1.2.8 ApePCNA の免疫沈降法及びイムノブロッティング

TBS-T 緩衝液 (10 mmol/L Tris-HCl; pH 7.6, 140 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100) 250 μL 中に

1.0 mg の精製した各 ApePCNA を加え、抗 PCNA 血清とともに室温で 30 分間インキュベートした。抗原抗体反応した複合体を、プロテイン A セファロース (GE Healthcare 社製) と室温で 30 分間反応させることで回収した。この沈澱を TBS-T 溶液で 3 回洗浄し、SDS サンプル緩衝液中で煮沸後、12% 濃度の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に用いた。泳動終了後のゲルを PVDF 膜に転写し、上述したウエスタンブロッティング法により解析した。

1.2.9 ケミカルクロスリンク法

Sulfoethylene glycol-bis succinimidyl succinate (Sulfo-EGS、Sigma 社製) を用いて、純化した ApePCNA のケミカルクロスリンク実験を行った (Zhang P. et al., 1995)。150 mmol/L 濃度の NaCl を含む 20 mmol/L 濃度のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に 50 μ mol/L 濃度になるよう Sulfo-EGS を溶解し、5.0 μ g/mL 濃度の ApePCNA を含む反応液 (10 μ L 容量) を調製した。クロスリンクさせた反応液は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に用い、その後ウエスタンブロッティングにより解析した。

1.3 結果

1.3.1 *A. pernix* ゲノム中に存在する 3 種の PCNA ホモログの同定

本菌株の全ゲノム配列解読プロジェクトより (Kawarabayasi et al., 1999)、真核生物の PCNA に相同と見られる配列をコードする遺伝子が 3 種発見された。本研究ではこれらの遺伝子について、遺伝子番号の若い順に APE0162 を PCNA1、APE0438 を PCNA2、そして APE2182 を PCNA3 と命名した。このうち ApePCNA1 は 263 アミノ酸からなり、分子量は約 29400 と推定された。同様に ApePCNA3 についても 251 アミノ酸及び約 28600 のタンパク質と推定された。その遺伝子配列及び推測されるアミノ酸配列を、Fig.1-2A 及び Fig.1-2C にそれぞれ示した。ApePCNA2 については、ウエスタンブロットでの移動度のちがいにより、分子量が異なるケースと、宿主によるタンパク質の修飾において差がある場合のいずれかが考えられた。ゲノム解析プロジェクトによって見出された、*A. pernix* ゲノム中の PCNA ホモログをコードする遺伝子の配列を再度精査したところ、報告された ApePCNA2 の N 末端側 48 塩基対上流に TTG コドンが存在した。もし ApePCNA2 の遺伝子の翻訳がこの TTG コドンから開始されていた場合には、PCNA2 分子が 16 アミノ酸長くなり (Fig.1-2B 下線部分参照)、全長で 249 アミノ酸をコードし、約 27900 の分子量を持ったタンパク質として発現すると推定される。よって当初報告された N 末端トランケート型の PCNA2 (233 アミノ酸、約 25900) を ApePCNA2S、新たに 16 アミノ酸が追加されたタンパク質を ApePCNA2L として、両者を調製して解析した。

また、推測されるアミノ酸配列を真核生物並びに他種のアーキアの PCNA ホモログと比較したものを Table 1-1 に示す。この表より、アーキア由来の PCNA 間の同一性は 16~38% の範囲に分布しており、その平均値は 24.5% であった。そして ApePCNA1、ApePCNA2L 及び ApePCNA3 のアミノ酸配列を他のクレンアーキオタの PCNA と比較したものを Table 1-2 に示す。配列から予測されるアライメントより、*A. pernix* の 3 種の PCNA はいずれも、ホモ 3 量体の環状構造を形成でき、DNA 合成の場面においてクランプとして機能すると予想された。

1.3.2 組換え体 ApePCNA のクローン化、発現及び精製

3 種の PCNA 様配列をコードする遺伝子を *A. pernix* のゲノムより直接 PCR することで増幅し、発

現ベクターである pET21a 中にクローン化した。このクローン化した遺伝子を大腸菌中で発現させ、3 種それぞれを ApePCNA1、ApePCNA2 及び ApePCNA3 とした。このうち、ApePCNA1 と ApePCNA3 については、加熱処理を行うことにより大部分の大腸菌由来のタンパク質を変性させて除去し、ポリエチレンイミンで処理することにより除核酸を行った。続いて、硫酸アンモニウム沈殿、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー及びヘパリンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行って、目的タンパク質を精製した。ApePCNA1 と ApePCNA3 は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、それぞれ約 29400 及び約 28600 の分子量のタンパク質として単一バンドで検出された (Fig.1-3A 及び 1-3C 参照)。これに対し ApePCNA2 に関しては、N 末端側が 16 アミノ酸長い ApePCNA2L については ApePCNA1 及び ApePCNA3 と同様の加熱処理を含む工程により精製可能であった (分子量約 27900、Fig.1-3B)。しかし ApePCNA2S は他の PCNA と比較して耐熱性において劣っていたため、加熱処理は行わず、ポリエチレンイミン処理、硫酸アンモニウム沈殿、疎水性カラムクロマトグラフィーの後、他のものと同様に陰イオン交換カラムクロマトグラフィー及びヘパリンカラムクロマトグラフィーを行うことで、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で約 25900 のタンパク質として検出された (Fig.1-3D)。精製した各 ApePCNA の N 末端側アミノ酸配列を分析したところ、いずれもゲノム DNA の配列から予測されたものと同一であった。

1.3.3 *A. pernix* 細胞抽出液における PCNA の検出

PCNA 様タンパク質が実際に *A. pernix* の細胞中で産生されているか、また大腸菌中で産生された組換え体タンパク質が *A. pernix* 由来のものとサイズの一致しているか確認するため、純化したタンパク質を用いてポリクローナル抗体を調製し、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、ApePCNA1、ApePCNA2L 及び ApePCNA3 についてはいずれも、純化した組換えタンパク質のバンドと *A. pernix* の細胞粗抽出液由来のバンドが、それぞれの特異的な抗体によってほぼ一致したサイズで検出された (Fig.1-4A~1-4C)。これに対し ApePCNA2S では、細胞抽出物由来のタンパク質よりも、組換えタンパク質はやや速く泳動された (Fig.1-4B の Lane.3)。これらの結果により、クローニングした 3 種の PCNA ホモログの遺伝子がいずれも *A. pernix* 細胞中で発現していること、さらに、ApePCNA2S については、電気泳動において組換え体と細胞由来のタンパク質とで移動度に差が出たことから、細胞中ではさらに N 末端側に 16 アミノ酸伸びる TTG を開始コドンとして翻訳されることが予想された。各タンパク質の N 末端アミノ酸配列は、塩基配列から予想されたものと同一であった。

1.3.4 DNA ポリメラーゼのプロセシビリティに与える各 ApePCNA の効果

これらの純化した PCNA ホモログに期待される生物学的機能の 1 つは、*A. pernix* 中に存在する DNA ポリメラーゼのプライマー伸長活性を促進することである。そのため *A. pernix* の PolI 及び PolII を使用し、ヌクレオチド取込みアッセイを実施した。その結果、ある程度差はあるものの 3 種すべての ApePCNA が、DNA 鎖中への RI 標識されたチミジンの取込みにおいて ApePolI 及び ApePolII の活性を促進していた (Fig.1-5)。

得られた結果を、まず各 ApePCNA を単独で働かせた場合について詳細に見ると、ApePCNA1 は ApePolI に対しては顕著な効果は示さなかったが、ApePolII においては取込み活性を 2~3 倍促進していた。環状 DNA と直鎖状 DNA での比較では、若干直鎖状 DNA を用いた時の方が促進するレベルが高かった。次に ApePCNA2 では、ApePolI に対し ApePCNA2L、ApePCNA2S のいずれも、2

倍程度の促進効果を示したが、直鎖状 DNA に ApePolII と ApePCNA2L を反応させた際は、約 4 倍に増加した。また ApePCNA3 は ApePolI では約 3 倍、ApePolII では 3~12 倍程度の促進効率であった。

次いでこれらの PCNA を混合して使用した場合の効果について検証した。ApePCNA1 と ApePCNA3 の組み合わせ及び ApePCNA2S と他のものを混合しても効果は見られなかったが、ApePCNA1 と ApePCNA2L、ApePCNA2L と ApePCNA3 ではより明確な促進効果が得られた。ApePolI では、それぞれ単独で用いたときよりも若干増加した程度であったが、ApePolII においてはより顕著であった。特に環状 DNA に対し ApePCNA2L と ApePCNA3 を反応させたときには、およそ 50 倍の促進効果が見られ、飛躍的に取込み量が増大していることを示す結果となった。このことは異なった PCNA 分子がヘテロなクランプ構造を持つ 3 量体を形成できることを示し、しかもより効果的に機能することができることを表す重要な結果である。

そして次に、上記で得られた RI 標識ヌクレオチドの取込み量の増大が、実際に ApePCNA ホモログによる DNA ポリメラーゼのプライマー伸長反応の促進によるものであるか確認するため、環状並びに直鎖状の M13 1 本鎖 DNA を基質として用いて、合成された生成物をアルカリ変性アガロースゲル電気泳動により分析した。

その結果は、Fig.1-6 に見られるように、予想通りほぼすべての ApePCNA が 2 種のポリメラーゼのプライマー伸長反応を促進していた。特に、標識ヌクレオチドの取込みにおいて劇的な効果を示した ApePCNA2L と ApePCNA3 の混合系では、非常に多くの最終伸長産物が得られた(各パネルの Lane 6)。この結果からも、ApePCNA2L と ApePCNA3 が相互作用し、ポリメラーゼ反応の際にクランプとしてより効果的に機能していると考えることができる。これに対し ApePCNA2S と ApePCNA3 との反応系では、それぞれを単独で用いた系と比べて大きな差は見られなかった(各パネルの Lane 5)。これらの結果より ApePCNA2L はその N 末端側 16 アミノ酸の一部または全部を含む領域が ApePCNA3 との相互作用に必要であり、クランプ活性に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。これに対し、ApePCNA2S は ApePCNA2L と同様に ApePCNA1 と相互作用する(1.3.5 項参照)ことから、ApePCNA1 との相互作用部位は、この N 末端 16 アミノ酸部分以外の他の領域にあることが推測される。

さらに、Fig.1-6A 及び 1-6C に見られるように、ApePCNA2L と ApePCNA3 の効果は環状 DNA テンプレートにおいてより顕著であった。直鎖状 DNA では各 PCNA 単独でも全長に近い伸長産物がある程度の量得られているが(特に ApePolI)、環状 DNA ではこの組み合わせ以外では全長の生成物がほとんど見られず、プロセシビリティ活性としては、ApePCNA2L と ApePCNA3 が最も有利なペアであると推定される。元々アーキアの PCNA は以前 *P. furiosus* の PCNA (PfuPCNA) において、直鎖上の基質 DNA のみでなく、環状の DNA についても DNA ポリメラーゼ活性を促進していることが観察されていた(Cann et al., 1999a)が、本結果においてもその結果が裏付けられ、しかも *A. pernix* の PCNA ホモログにおいては、ヘテロな PCNA の組み合わせにより環状 DNA に対する DNA ポリメラーゼ活性の促進効果が強く見られたことは、真核生物の PCNA で知られていた性質とは異なる、アーキア PCNA 独自の性質として特筆すべきことである。

1.3.5 ApePCNA 間の相互作用について

各 ApePCNA ホモログが物理的に相互作用しているか確認する目的で、3 種の ApePCNA に対して作成した抗体を用いて免疫沈降実験を行った。まず精製した ApePCNA1、ApePCNA2S そして

ApePCNA3を用いた実験(Fig.1-7A～1-7C)では、ApePCNA1とApePCNA2S(Lane 4)が相互作用し共沈降するという結果が得られた(Fig.1-7A 及び 1-7B)。これに対し ApePCNA2L を用いた実験(Fig.1-7D～1-7F)では、ApePCNA1と(Lane 4)のみならず ApePCNA3とも反応していた(Lane 6)。このことから、ApePCNA2S では欠けていた ApePCNA2L の N 末端側領域において ApePCNA3と相互作用していることが裏付けられたと考えられる。ApePCNA2Lを含む3種すべてのPCNAを混合した反応系では、いずれの抗体を用いた時でもバンドが現れた(Fig.1-7D～1-7F、Lane 7)。これに対し、ApePCNA1とApePCNA3を共存させ検出しても、ApePCNA2の抗体ではバンドが現れず、直接的な相互作用は見られなかった(Lane 5)。従って、ApePCNA1とApePCNA3は、ApePCNA2Lを介することで間接的に相互作用していることが考えられ、ApePCNA2LがApePCNA1及びApePCNA3と作用する領域は、それぞれ異なっていると予測される。

A. *pernix* の細胞抽出液を、3種のApePCNAに対する抗体と反応させ、Protein A-セファロースを用いて集めた後、電気泳動及びウエスタンブロッティングにより分析した。ApePCNA1とApePCNA2Sは相互作用し(Fig.1-7G)、またApePCNA2SとApePCNA3も相互作用していた(Fig.1-7H)。細胞抽出液中のApePCNA2は、Fig.1-4B(Lane 2)で示したように、N末端側が16アミノ酸長いApePCNA2Lの形で存在していることが確認できたと考えられる。またApePCNA2LはApePCNA3と反応できることから、Fig.1-7IにおいてもApePCNA2のバンドが検出されている。

これらの免疫沈降実験による相互作用解析の結果は、プライマー伸長アッセイにおいてApePCNA2Sは他のApePCNAと共存させてもそれほど効果を示さないが、ApePCNA2Lは特にAprPCNA3と同時に反応させた場合に、ApePolI及びApePolIIの両方に対して高い促進効果を示したことを裏付けるものであると考えられる。この実験では、ApePCNA1とApePCNA2Sが複合体を形成することが判明したが、この組み合わせは、ApePolI及びApePolIIのプロセシビティ向上に特異的に寄与しているわけではなさそうである。ヘテロ型のPCNA複合体の最適な構造を特定し、その生理学的機能を知るためには、よりいっそう高度な検討が必要と考えられる。

1.3.6 各 ApePCNA の細胞中での分子量評価(クロスリンク試験)

ApePCNAホモログがリング状の3量体構造を形成しているかどうか調べるため、純化・精製した組換え体タンパク質を用い、ケミカルクロスリンク実験を行った。Fig.1-8に示したように、いずれの分子もそれぞれ単独でクロスリンク反応に供することによって、SDS-PAGE上でより大きな分子量の位置に泳動された。この結果は、各PCNA分子のプロトマーがSulfo-EGSにより迅速に架橋されたことを示している(Lane 2)。図から、主に3種類の架橋した構造体が見いだされる。1つは1ヶ所で架橋した2量体、2番目は2ヶ所で架橋した直鎖状3量体、そしてもう1つは、3ヶ所で架橋した環状構造の3量体である。これらはいずれも、以前にT4ファージのgp45タンパク質で示された(Jarvis et al., 1989)架橋タンパク質のバンド移動度により各分子の複合体構造を評価したものである。同様な反応条件で複数のApePCNAをクロスリンクさせたところ、ApePCNA1とApePCNA2L、ApePCNA2LとApePCNA3を共存させた際には単独での結果と比較して新たなバンドの形成が見られた。まずApePCNA1とApePCNA2Lでは、それぞれ単独でのバンドよりも共存させたものの方が若干ではあるが高分子量側に濃くなり、新たなヘテロ複合体の形成を伺わせる結果が見られた(Fig.1-8A 及び Fig.1-8B)。次にApePCNA2LとApePCNA3について同様に実施したところ、高分子量側への移動度はさらに大きく、抗ApePCNA3抗体での検出では3量体形成したと見られるバンドが明らかに濃くなり、生じた複合体が量的に増大していることが予測される(Fig.1-8C)。この結果は、ApePCNA2Lと

ApePCNA3 との結合能が、ApePCNA1 と ApePCNA2L とのそれよりも高いことを示唆している。この他に見られるいくつかの新たなマイナーバンドについても、クロスリンクしたヘテロな複合体の形成を予測させるものである。

1.4 考察

本研究では、*A. pernix* の DNA ポリメラーゼの PCNA ホモログをコードする遺伝子をクローン化し、その産物を解析した。これらのホモログは実際に *A. pernix* の PolI 及び PolII のプライマー伸長能力を促進していた。この事実は、3 種の ApePCNA がすべて DNA ポリメラーゼのクランプとして機能できることを示唆している。3 種の ApePCNA が、それぞれ異なった局面でどのように機能しているかを明らかにすることが重要であると考えて、特定の DNA ポリメラーゼと PCNA との組み合わせの存在の有無を調べるため、ApePolI 及び ApePolII に対する ApePCNA の促進効果について詳細に検討した。

実験の結果は、3 種類の PCNA ホモログがいずれも 2 種のポリメラーゼに対してクランプ活性を示していたが、さらに、ApePCNA2L と ApePCNA3 とが協働することにより、それぞれ単独の場合に比べ飛躍的にプライマー伸長活性を促進していた。Fig.1-6 に示したように、基質として用いた M13DNA において、その全長である約 7250 塩基対の伸長産物を最も多く生成したのは、ApePolI、ApePolII のいずれでも、この 2 種の PCNA の組み合わせであった。ケミカルクロスリンク反応の結果から、ApePCNA2L 及び ApePCNA3 によるヘテロ型の複合体が形成していることが予想され、複数の PCNA がヘテロ複合体を形成して、共働して伸長活性を高めるという最初の例である。構造的には、ApePCNA2L と ApePCNA3 はアミノ酸数も近く分子量が似ており(249 アミノ酸と 251 アミノ酸、分子量約 27900 と約 28600)、そのため交換が可能で、同じ大きさの環状構造を形成することができると考えられる。

今回調製した 3 種の PCNA タンパク質は、それぞれ ApePCNA1 と ApePCNA3 が GTG コドンから、ApePCNA2L は TTG コドンから始まっており、いずれも通常の開始コドンである ATG ではない。第二章で述べる ApeRFC の大小各サブユニットについても、ともに TTG コドンから開始されており、第三章で述べる DNA ポリメラーゼについても、TTG が開始コドンとして使われている。その理由については現時点では明らかではないが、翻訳開始に関わる tRNA のイソアクセプターの存在量を比較するなどにより、進化的背景を含んだ新たな法則性が見出されるかもしれない。

A. pernix のゲノム配列を見ると、ApePCNA2 遺伝子のコーディング領域はその C 末端部分で下流に位置するプライマーゼのホモログの N 末端部分とオーバーラップしていると推定される(Fig.1-9)。重なっている部分は 23 塩基分、アミノ酸 7~8 残基分に相当し、さらにプライマーゼの C 末端領域は、その下流の機能未知のタンパク質(APE0437)の N 末端部分と重なり合っていると予想されている。このことから、ApePCNA2 がプライマーゼによる複製開始時のプライミングの際にも機能している可能性も予想され、非常に興味深い。プライマーゼとの相互作用を分析すれば、新たな ApePCNA2 の新たな機能が見出されるかもしれない。

本研究の後で、*Sulfolobus* 種の、*Sulfolobus solfataricus* (She et al., 2001) 及び *Sulfolobus tokodaii* (Kawarabayasi et al., 2001) の全ゲノム配列より、同様に 3 種の PCNA 様配列が確認され、性質解析がなされた。予想されるアミノ酸配列を *A. pernix* の PCNA の配列と比較した。Table 1-2 に示したように、*S. solfataricus*-0405 (SSO0405) と *S. tokodaii*-0387 (STO0387)、*S. solfataricus*-1047 (SSO1047) と

S. tokodaii-0944 (STO0944)、そして *S. solfataricus*-0397 (SSO0397) と *S. tokodaii*-0397 (STO0397) が、配列の相同性より、それぞれホモログ同士であると考えられる。しかし、これらに対する 3 種の ApePCNA の配列の同一性は非常に低く、25% 程度以下でしかない。アミノ酸配列のアライメントから判断すると、ApePCNA1 は上記 SSO0405 のペアと、ApePCNA2 は SSO1047 のペアと、そして ApePCNA3 は SSO0397 のペアと組になることが推測される (Fig.1-10)。

酵母及びヒト由来の Pol δ 活性サブユニットの DNA ポリメラーゼ活性について評価した研究により、PCNA と結合するために重要だと考えられているサブユニット中のコンセンサスモチーフである、GX4GX8GX3YFY が見出されている (Zhang S. J. et al., 1995)。*A. pernix* の PolII は、その N 末端領域にこのコンセンサスモチーフと似た配列を持つ。一方、ApePolI には、このような配列は見られない。これとは別に、PCNA と相互作用することが知られている、細胞周期のチェックポイントタンパク質 p21 やエンドヌクレアーゼ FEN1 及び XPG 等を含む多くの PCNA 結合タンパク質には PCNA と相互作用するためのコンセンサス配列として PIP-box (PCNA-interacting protein box) と呼ばれるオクタペプチド配列モチーフが保存する (Warbrick, 1998, Warbrick, 2000, Warbrick et al., 1997)。*A. pernix* の PolII は、その C 末端領域中に PIP box と似た配列 (QSTLLDFM) をもっている。また一方で、ApePolI 中にはこのモチーフボックスは含まれていない。PolII は、PolI と比べて PCNA の要求性が高い (Fig.1-5)。ApePolI は ApePolII よりも *in vitro* での PCNA 非要求性のプライマー伸長活性に富んでいる (Cann et al., 1999b)。それぞれの DNA ポリメラーゼと各 PCNA との相互作用の強さに関しては、定量的な解析が必要である。

A. pernix の PolI と PolII に対する PCNA の要求性を比較すると、総じていずれの PCNA も ApePolII の伸長活性をより促進していた。真核生物の DNA ポリメラーゼと照らし合わせると、より PCNA の要求性が高い DNA ポリメラーゼ δ と ApePolII が、要求性がそれほど高くない DNA ポリメラーゼ ϵ と ApePolI が、それぞれ対応するのではないかと考えられる。真核生物では、主に Pol δ がラギング鎖を、Pol ϵ がリーディング鎖を合成しているので、*A. pernix* では、ApePolI が主にリーディング鎖を、そして ApePolII がラギング鎖の合成を受け持つという形が想像できる。しかし、*A. pernix* では未だ両酵素とも複製に必須であるという証拠も得られていない。アーキアでもクレナーキオタ以外の門に属するものは PolD というアーキアだけに存在する DNA ポリメラーゼを有しており、PolD と PolB が複製に関わっていると考えられてきた。*P. furiosus* や *Pyrococcus abyssi* の PolB 及び PolD について解析された結果から、PolD が RNA プライマーからの鎖伸長活性を持つこと、また鎖置換活性を有していることにより、PolD がラギング合成を担い、PolB がリーディング合成を行うと予想されてきた (Henneke et al., 2005, Ishino and Ishino, 2005)。クレナーキオタは PolD を持たない代わりに、PolB が複数存在するので、これらを解析することによりクレナーキオタの複製機構の理解の進展に寄与できると考えられる。

通常、環状 DNA 鎖へリング型のクランプを開環させてローディングさせるためには、クランプローダーが必要であるが、*A. pernix* の研究では、*P. furiosus* で最初に見出された結果 (Cann et al., 1999b) と同様に、*A. pernix* の 2 種の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応において、環状の DNA 鋳型を用いたときでも ApePCNA による伸長促進を受けた。酵母及びヒト由来の PCNA の結晶構造解析により、リング構造形成のためのプロトマーの相互作用様式は、酵母で 7 ヶ所、ヒトでは 8 ヶ所の主鎖上の水素結合であることが読み取れたが、一方で、PfuPCNA のサブユニットの主鎖においては、4 本しか水素結合が存在していなかった (Gulbis et al., 1996, Krishna et al., 1994, Matsumiya et al., 2001)。多くの PCNA 配列のアライメントを解析したところ、アーキアの PCNA のインターフェイスを構

成するループ中に、いくつか欠失があることが判明した (Fig.1-11)。ApePCNA1 と ApePCNA2 は最初のインターフェイス中に (図中実線矢印部分)、また ApePCNA3 についても 2 番目のインターフェイス (図中点線矢印部分) において、いくつかの欠失が見られる。このように、*A. pernix* の PCNA ではサブユニット間の結合が弱いことが予想されるので、通常真核細胞において DNA 上に PCNA をロードするために必要な RFC のクランプローディング活性が無くても、PCNA は自発的に DNA 上にロードできるかもしれない。しかしながら、*A. pernix* の中には、RFC ホモログも存在している。*P. furiosus* (Cann et al., 2001) や *S. solfataricus* (Pisani et al., 2000) での研究結果と同様に、*A. pernix* の細胞内においても RFC のクランプローディング活性によって、ローディング効率が上昇する可能性もある。この ApeRFC ホモログと 3 種の PCNA との関係については後述する。

3 種類のチェックポイントタンパク質である Rad1、Hus1、Rad9 が PCNA のようなドーナツ型の構造をとり、また Rad17 が RFC の 4 種の小サブユニットとともにクランプローダー複合体を形成する。この Rad17 を含むクランプローダーは、Rad1-Hus1-Rad9 のヘテロ環状 3 量体に対して特異的に働く (Cai et al., 2000、Caspari et al., 2000、Rauen et al., 2000、Venclovas and Thelen, 2000)。このクランプ様分子は損傷修復に特異的な DNA ポリメラーゼをリクルートする役目も担う。*A. pernix* の 3 種の PCNA ホモログが他の分子と互いに相互作用するか否かについて議論するために、*A. pernix* のゲノム配列中に、損傷乗り越え活性を有する DinB/UmuC/Rev1/Rad30 などのファミリー Y の DNA ポリメラーゼ (Ohmori et al., 2001) のホモログを検索したが、はっきりと相同性を示すものは発見できなかった。しかし、*Sulfolobus* 属には DinB タンパク質のホモログと見られる遺伝子をコードする配列が見つかり (Kulaeva et al., 2001)、その遺伝子産物は損傷部位を乗り越えて機能できる (Zhou et al., 2001)。*A. pernix* については、ファミリー Y の DNA ポリメラーゼ配列とは相同性のない別の損傷乗り越え DNA ポリメラーゼを持っている可能性もあり、それが本研究の PCNA ホモログと相互作用する可能性もあり、今後の研究の進展が待たれる。

第二章

2. DNA ポリメラーゼと複製因子 C (RFC) の相互作用

2.1 序論

真核生物の DNA 複製システムにおいて、RFC 及び PCNA は、複製的な DNA 合成や修復的な局面に関わる DNA ポリメラーゼの補助因子である (Waga and Stillman, 1998)。真核生物における複製型 DNA ポリメラーゼ (Pol δ 及び Pol ϵ) は非常にプロセシブであり、すなわちテンプレートから離れることなく長鎖の DNA を合成できることを意味する。このような特徴は、第一章で述べたように、2 本鎖 DNA 上にリング構造を形成しその上を自由に移動できる環状ホモ 3 量体タンパク質である PCNA によりこれらの DNA ポリメラーゼに付与される。PCNA の DNA 上へのローディングには、4 種の異なった小サブユニットと 1 種の大サブユニットからなるクランプローダーが必要である。この一般的にクランプローダーと呼ばれる分子は、真核生物、アーキアでは Replication factor C (RFC) である。クランプローダーはまずプライマーの 3'-末端を認識することができ、PCNA に結合してドーナツ型の環を開き、そして PCNA の開環した部分から DNA を通す。バクテリアやバクテリオファージのシステムにおいても、複製的な DNA ポリメラーゼのプロセシブな DNA 合成のために、このようなクランプ様分子を必要とする。これらの各分子は、真核生物のものとはかなり異なっているものの、クランプローディングの分子機構については基本的によく保存されている。これらのうち、クランプローダーとしてよく知られているものとしては、*E. coli* の DNA ポリメラーゼ III (PolIII) β サブユニット (クランプ) に対する γ サブユニット及び、T4 ファージの gp45 (クランプ) に対する gp44/gp62 がある (Kelman and O'Donnell, 1995、Young et al., 1992)。

A. pernix のゲノム配列中に、2 種の RFC のホモログと考えられる配列が見出された。この 2 種の RFC 様タンパク質の機能を探るため、ゲノム中にタンデムに配置された遺伝子をそれぞれクローン化し、大腸菌中で発現させ、その産物を生化学的に解析した。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料及び機器

本実験において使用した試薬等については、特に表記しない限り試薬特級または分子生物学研究用グレードのものを使用した。またタンパク質材料を精製・純化するために使用した HiTrap カラム等のクロマトグラフィー用の担体については、特に示さない限り GE Healthcare 社製のものをを用いた。カラムクロマトグラフィーを実施する際、送液システムとして AKTA Explorer 10S (GE Healthcare 社製) を使用した。DNA の抽出・精製に関しては、挿入 DNA のチェックのための粗抽出には抽出機器 PI-50 (クラボウ社製) とその専用試薬を、クローニング及び高純度の精製用には、GFX Micro Plasmid Prep キット (GE Healthcare 社製) を使用した。また制限酵素でプラスミドベクターから切り出した DNA 断片の精製には、MinElute Gel Extraction キット (Qiagen 社製) を用いアガロースゲルより回収した。制限酵素については、東洋紡社製、タカラバイオ社製または New England Biolabs 社製のいずれかから購入した酵素を使用した。その他の各種試薬キット類については、基本的にキット添付の取扱説明書に従い使用した。その他分析用の機器などについても同様に操作し、結果を得た。

2.2.2 *A. pernix* の RFC ホモログをコードする遺伝子のクローニング

A. pernix のゲノム中に見出された RFC ホモログと見られるタンパク質をコードする遺伝子を、PCR 法により増幅した。2 種の RFC ホモログをそれぞれ増幅するため、以下の 4 種類のプライマーを準備した。下線部は、NdeI または BamHI の制限酵素サイトを示している。

ApeRS-F: 5'- GCGAACCATAT GTCCAGCGTT CTGGAG -3'

ApeRS-R: 5'- CATATGATC CTTACTATAC CTCCAGTTT -3'

ApeRL-F: 5'- GCGAACCATAT GCCGATAGTA GCCCGCT -3'

ApeRL-R: 5'- CATATGATC CTTATTATTG CTCACCTAG -3'

PCR の条件は、鋳型となる *A. pernix* の DNA を十分変性させるため、まず 94℃ で 2 分加熱した後、94℃ で 30 秒変性、60℃ で 30 秒アニール、そして 72℃ で 30 秒伸長反応させるサイクルとし、これを 25 回繰り返した。サイクル終了後、増幅産物の伸長を完了させる目的で、さらに 72℃ で 5 分加熱した。増幅の際のフィデリティを保つため、PfuDNA ポリメラーゼ (Stratagene 社製) を使用した。

増幅した PCR 産物は、TA-クローニングベクター (pGEM-T Easy: Promega 社製) と連結させ、大腸菌のコンピテントセル (*E. coli* JM109 株、タカラバイオ社製) を形質転換するために使用した。得られた組換え体の中から幾つかの独立クローンを選択し、それらについてキャピラリーシーケンサー (ABI Prism 310 Genetic Analyzer: Applied Biosystems 社製) を用いて挿入 DNA のヌクレオチド配列を調べた。*A. pernix* の RFCS 及び RFCL の配列であることが確認された遺伝子を NdeI 及び BamHI で切り出し、同じ制限切断末端を持つ pET21a 発現ベクター (Novagen 社製) 中に組み込んだ。断片を組み込む際には、Ligation High (東洋紡社製) を使用した。構築したプラスミドは、それぞれ pAP-RFCS 及び pAP-RFCL とした。

2.2.3 組換え体 ApeRFCS の発現と精製

pAP-RFCS を保持した *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株 (Stratagene 社製) を、最終濃度 100 µg/mL のアンピシリンと、20 ng/mL のクロラムフェニコールを加えた、Luria-Bertani 培地 1 L に接種し、OD 600nm が 0.5 になるまで 37℃ で培養した。OD が 0.5 に到達した後、最終濃度が 1.0 mmol/L になるようイソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を加え、さらに 3 時間培養した。

得られた菌体を遠心分離により集菌し、緩衝液 A (50 mmol/L Tris-HCl; pH8.0、0.1 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L ジチオスレイトール、10% グリセロール) 25 mL に懸濁した後、超音波破碎により大腸菌の菌体を破壊した。菌体残渣を、30000 × g で 15 分間、4℃ で遠心分離して除いた。次にこの溶液を 75℃ で 15 分加熱処理することで、大腸菌由来のタンパク質を沈澱させ、遠心分離することで除去した。得られた上清溶液に、ポリエチレンイミン溶液 (最終濃度 0.2% ポリエチレンイミン、0.5 mol/L NaCl) を加え、4℃ で 30 分間スターラーを用いて攪拌し、沈澱した DNA 等の核酸成分を遠心分離により除き、タンパク質成分を回収した。

このタンパク質を含む上清液 30 mL に、80% 飽和となるよう硫酸アンモニウム粉末 16.8 g を加えて沈澱させた。この沈澱を緩衝液 B (50 mmol/L Tris-HCl; pH8.0、0.1 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L ジチオスレイトール、10% グリセロール、0.1 mol/L NaCl) に溶解させ、そしてこの緩衝液 B に対して透析した。

この溶液を、高速液体クロマトグラフィーシステム (AKTA explorer 10S、GE Healthcare 社製) に接続した陰イオン交換カラム (HiTrap Q; 5 mL 容量) にかけた。クロマトグラフィーは、流速 2 mL/min で、

50 mL の 0.1~1.0 mol/L 濃度の NaCl グラジエントを含む緩衝液 A で行った。RFCS は塩濃度が 0.3~0.4 mol/L の範囲で溶出された。

陰イオン交換カラムの後、RFCS を含む画分をプールし、緩衝液 B に希釈して、アフィニティーカラム (HiTrap heparin; 1 mL 容量) にかけた。流速 1 mL/min で、0.1~1.0 mol/L 濃度の NaCl グラジエントを含む緩衝液 A で展開した。ApeRFCS は塩濃度が 0.15~0.3 mol/L の範囲で溶出された。得られた RFCS タンパク質を緩衝液 A に対し 4°C で一晩透析することで脱塩を行い、RFC 小サブユニットの精製標品とし、以下の評価に使用した。

2.2.4 組換え体 ApeRFC 複合体の発現と精製

ApeRFC の大サブユニットを大腸菌中において単独で発現させ精製を試みたが、加熱処理の工程において変性してしまい、活性型のタンパク質を得ることができなかった。そのため、クローン化した RFCL を RFCS と共発現させる系を試行した。最初に RFCS 遺伝子を、pET21a からカナマイシン耐性を持つプラスミドベクター pET28a (Novagen 社製) に移し変えた。この際、RFCS のプラスミドを NdeI と BamHI で切断し、同じ制限酵素で処理したベクターと、Ligation High (東洋紡社製) を用いて連結した。このプラスミドを pAP-RFCS28 とした。

次に *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株を pAP-RFCS28 と pAP-RFCL の 2 つのプラスミドで形質転換させ、得られた組換え体を、アンピシリン (100 µg/mL)、クロラムフェニコール (20 ng/mL) 及びカナマイシン (70 µg/mL) を含む Luria-Bertani 培地を用いて 37°C で一晩培養した。この培養菌体を、同様に抗生物質を含む LB 培地 1 L に植菌し、37°C で OD 600nm が 0.4 に達するまで培養した。そして、最終濃度 1.0 mmol/L のイソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を加え、さらに 4 時間培養した。

菌体を集菌し、緩衝液 B 25 mL に懸濁した後超音波破碎により大腸菌の細胞を破壊した。そして菌体残渣を 30000 × g で 15 分間 (4°C) 遠心して除き、さらに 75°C で 15 分間加熱処理を行うことにより、大腸菌由来のタンパク質を変性させた。遠心により変性タンパク質を除いた上清溶液に、ポリエチレンイミン溶液 (最終濃度 0.2% ポリエチレンイミン、0.5 mol/L NaCl) を加え、4°C で 30 分間スターラーにより攪拌し、沈殿した DNA 等の核酸成分を遠心分離により除き、タンパク質成分を回収した。この溶液 (30 mL) に、80% 飽和となるよう硫酸アンモニウム粉末 16.8 g を加えて沈殿させた。沈殿を集め緩衝液 A に溶かし、次いで緩衝液 B に対して透析した。

透析して得られた内液を、高速液体クロマトグラフィー装置 (AKTA explorer 10S) に接続した陽イオン交換カラム (HiTrap-SP; 1 mL 容量) にかけた。クロマトグラフィーは、流速 1 mL/min、0.1~1.0 mol/L の NaCl による直線グラジエントを含む展開溶液 25 mL で行った。ApeRFC 複合体は塩濃度 0.3~0.5 mol/L の範囲で溶出された。

陰イオン交換カラムの後、ApeRFC 複合体を含む画分をプールし、緩衝液 B に希釈して、陰イオン交換カラム (HiTrap Q; 1 mL 容量) にかけた。クロマトグラフィーは、流速 1 mL/min、0.1~1.0 mol/L の NaCl による直線グラジエントを含む展開溶液 25 mL で行った。ApeRFC 複合体は塩濃度 0.2~0.3 mol/L の範囲で溶出し、SDS-PAGE の結果 2 種の ApeRFC 以外のバンドは見られなかった。得られたタンパク質を含む画分を集め、緩衝液 A に対して透析し、ApeRFC 複合体の精製標品とした。

2.2.5 ATPase 活性の測定

ATPase 活性測定用緩衝液 (25 mmol/L Tris-HCl, pH8.0、6.0 mmol/L MgCl₂、0.1 mmol/L ジチオ

スレイトール)中に最終濃度 25 $\mu\text{mol/L}$ ATP を加えた溶液を準備し、ApeRFC の ATPase 活性を測定した。基質として、10 ng 分に相当する M13mp18 1 本鎖 DNA を用いた。ここに各 ApePCNA 溶液 (10 pmol/ μL)、ApeRFCS または ApeRFC 複合体の溶液及び ^{32}P - α -ATP を添加し、65°C に加温することで反応を開始した。開始後適当な時間に 1.0 μL ずつサンプリングし、TLC プレート上にスポットした後、このプレートをよく乾燥させた。スポットしたプレートを、展開溶液 (0.5 mol/L LiCl、1.0 mol/L HCOOH) 中で約 10 分展開した後十分に乾燥させ、ラップで包み検出用機器 BAS-5000 (富士フィルム社製) で視覚化した。

2.2.6 DNA ポリメラーゼによるヌクレオチドの取込み実験

ApePolI 及び ApePolII は、これまでに述べた方法により調製した (第一章参照)。この 2 種の DNA ポリメラーゼを用いて、ApeRFC 複合体の存在下及び非存在下で、ヌクレオチド取込みアッセイを実施した。添加する PCNA として、ApePCNA1、ApePCNA2L、ApePCNA3 及び ApePCNA2L と ApePCNA3 の等量混合したものを使用した。鋳型として、環状 M13mp18 1 本鎖 DNA の 6204 位置から 6233 位置に相補的な 30 塩基長のオリゴマーである、5'- ATTCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCCTG -3' をアニールさせたものを用いた。

ヌクレオチド取込みアッセイについては、先に記載した方法と同様にして実施した。DNA ポリメラーゼ用反応緩衝液中で、M13 1 本鎖 DNA 及びプライマーを使用し、3 分間煮沸後徐冷することでアニールを行った。DNA ポリメラーゼを添加した混合液から 20 μL を取り、ApeRFC 複合体の存在下及び非存在下で、上記した各種 ApePCNA を加えて DNA ポリメラーゼ反応を実施した。各 DNA ポリメラーゼ反応は、ApePolI では 70°C で 5 分間、ApePolII では 70°C で 20 分間実施した。反応終了後、混合液のうち 20 μL をとり、DE81 フィルター (Whatmann 社製) 上にスポットした。このフィルターを 5% 濃度の Na_2HPO_4 溶液で 3 回洗浄し、DNA 鎖中に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンタで測定した。

2.2.7 プライマー伸長反応の分析

ApePCNAs 及び ApeRFCS または ApeRFC 複合体の存在下及び非存在下での ApePolI 及び ApePolII のプライマー伸長活性を、アルカリアガロースゲル電気泳動法により検出した。1 反応あたりのテンプレート-プライマー基質として、2.0 pmol の ^{32}P でラベルしたプライマーを M13mp18 環状 1 本鎖 DNA (0.2 μg 相当) にアニールさせたものを用いた。その際 DNA ポリメラーゼ用の反応 Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, pH8.8、100 mmol/L NaCl、5.0 mmol/L MgCl_2 及び 2.0 mmol/L 2-メルカプトエタノールを含む) 中で 95°C、3 分間加熱し、室温まで徐々に冷却することによりアニールを完了させた。こうして得られた基質溶液に、目的のアクセサリタンパク質 (PCNA または RFC) と DNA ポリメラーゼ (0.5 U 相当) を加えることで反応溶液を調製した。そして反応は、最終濃度が 250 $\mu\text{mol/L}$ になるようデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸 (dNTP) を加えることで開始した。DNA ポリメラーゼ反応は開始後 70°C で 4 分間行った後、停止液 (98% 脱イオン化ホルムアミド、1 mmol/L EDTA、0.1% キシレンシアノール、0.1% ブロモフェノールブルーを含む) 6.0 μL を加えた。各反応液を 12.0 μL ずつとり、1.0% 濃度のアルカリアガロースゲルを用いて電気泳動することにより分析した。

2.2.8 ウェスタンブロッティングと N 末端アミノ酸配列の解析

得られた ApeRFCS が *A. pernix* の細胞中で発現しているか確認するため、ApeRFCS の抗血清を

作成し、精製 ApeRFCS 及び細胞抽出液に対してウエスタンブロッティングを実施した。方法は、先の記載に準じて行った。

また ApeRFCS の N 末端アミノ酸配列を確認するため、精製したサンプルを 10%濃度のポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画し、PVDF 膜上にエレクトロブロットした。次いでこの膜を 0.2%濃度の CBB-R250 染色液で染色し、5%メタノール溶液で脱色した。染色されたタンパク質のバンドに相当する部分を切り出し、50%メタノール溶液で 3 回洗浄した。洗浄した膜を十分乾燥させた後、自動エドマン分解によるアミノ酸シーケンサーで分析した。

2.3 結果

2.3.1 *A. pernix* のゲノム中に存在する RFC ホモログの同定

A. pernix のゲノム配列に対してホモロジー検索を行ったところ、真核生物の RFC と相同性を持つ 2 種類のオープンリーディングフレーム APE1522 及び APE1524 が見出された (Fig.2-1)。これらの遺伝子は *A. pernix* のゲノム上にこの順にタンデムに並んでおり、それぞれ、325、479 アミノ酸からなるタンパク質をコードしうるものであった。分子量についてはそれぞれ約 37300 及び約 54800 と推定された (Fig.2-2)。2 つの遺伝子配列は非常に近接しており、先行する APE1522 の終止コドン TAG と、これに続く APE1524 の開始コドン TTG の間は、わずか 4 塩基 (いずれも G) しか存在しなかった。遺伝子の大きさとこれまでの知見から、分子量が小さいサブユニット APE1522 を ApeRFCS、大きいサブユニット APE1524 を ApeRFCL と命名した。

アーキアの RFC では、RFCS と RFCL は共にその N 末端側領域に、真核生物の RFC タンパク質が所有する共通の配列 (RFC ボックス II から VIII) が存在することが知られていた (Cann et al., 2001)。リガーゼモチーフとして知られている RFC ボックス I は、真核 RFC の大サブユニットにのみ見出されており、アーキアの RFC では欠失しているという報告と同様に、*A. pernix* の RFC ホモログにも無かった。*A. pernix* の RFCS のアミノ酸配列は、最初に解析された *P. furiosus* のものと、その後ゲノム解析された各種アーキア、*S. solfataricus*、*S. tokodaii*、*Methanothermobacter thermoautotrophicum*、*Archaeoglobus fungidus*、*Methanococcus jannaschii* の各ホモログに対し、それぞれ 65、66、61、52、55、53%の同一性を示す。また真核生物の RFC 小サブユニットと比較すると、*Saccharomyces cerevisiae* の RFC4 及びヒトの RFC2 (RFC40) との同一性は、それぞれ 43 及び 42%であった。RFCL については、*S. solfataricus*、*S. tokodaii*、*P. furiosus*、*M.thermoautotrophicum*、*A. fungidus*、*M. jannaschii* の各ホモログに対し、それぞれ 44、45、37、34、35、33%である。すべてのアーキア RFCL はボックス I を含む真核 RFC 大サブユニットの N 末端領域を欠いていた。RFCL について真核生物の RFC と比較する際には、そのボックス II から始まる部分との比較を行ったところ、*A. pernix* の RFCL が、*S. cerevisiae*、*Drosophila melanogaster*、*Caenorhabditis elegans* 及びヒトの各 RFC 大サブユニットのホモログに対して、それぞれ 26、27、23、31%の同一性を示していた。また、*P. furiosus* の RFC 小サブユニットには、Walker A モチーフと呼ばれる N 末端よりの領域に、インテインをコードする約 1600 塩基対の大きさの配列が存在するが (Cann et al., 2001)、*A. pernix* の RFC 遺伝子中には存在しない。これまでに解析されている *S. solfataricus* の RFC の配列中にもインテインの存在は確認されておらず、クレンアーキオタでの報告は現時点ではないようである。あるいは、*P. furiosus* のようなユーリアーキオタに特有の現象なのかもしれない、今後の解析が待たれる。

2.3.2 組換え体 ApeRFCS 及び ApeRFC 複合体のクローン化、発現並びに精製

まず ApeRFCS と ApeRFCL の遺伝子をそれぞれ独立にクローン化し、大腸菌で発現させることを試みた。組換え RFCS は、加熱処理による大部分の大腸菌由来タンパク質の変性、ポリエチレンイミン処理による DNA の除去、硫酸沈澱、そして陰イオン交換体である Q-Sepharose カラム及びアフィニティークロマトである Heparin カラムにより精製した。各精製工程の SDS-PAGE の結果を、Fig.2-3A に示した。得られた ApeRFCS の N 末端アミノ酸配列を分析したところ、SSVL と読むことができ、これは遺伝子配列から予測された RFCS の 2 番目から 5 番目のアミノ酸と完全に一致した。末端のメチオニン残基は翻訳された後でプロセッシングを受けたと考えられる。

一方、ApeRFCL は、単独で大腸菌で発現させることを試みたが、加熱処理工程において変性してしまい、精製することが困難であった。そのため、ApeRFCS と共発現させることとした。共発現の実施に際し、異なった薬剤耐性プラスミドを準備する必要があるため、まず ApeRFCS 遺伝子の配列を、pET21a(アンピシリン耐性)から pET28a(カナマイシン耐性)に移し変えた。pAP-RFCS プラスミドを制限酵素 Nde I と Bam HI で切断し、得られた RFCS 遺伝子の断片を同様の制限酵素により処理した pET28a ベクターに連結した。作成したプラスミドを pAP-RFCS28 とした。次に *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株を pAP-RFCS28 と pAP-RFCL の 2 つのプラスミドで形質転換させ、得られた組換え体を、アンピシリン、カナマイシン及びクロラムフェニコールを含む LB 培地で培養し、目的のタンパク質を産生させた。発現した組換え ApeRFC 複合体は、加熱処理による大部分の大腸菌由来タンパク質の変性、ポリエチレンイミン処理による DNA 等の核酸様物質の除去、硫酸沈澱、そして陽イオン交換体である SP-Sepharose 及び陰イオン交換体である Q-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより精製した。各工程のサンプルを SDS-PAGE にかけた結果を、Fig.2-3B に示した。この図における ApeRFCS は、pET28a ベクターに含まれるヒスチジンタグの付加により、Fig.2-3A と比べて若干分子量が増大している。ApeRFCL は、単独では精製することが困難であったが、ApeRFCS と共発現させることで、ApeRFC 複合体の形で精製した。この結果は、すでに報告されていた *P. furiosus* の RFCL タンパク質が単独では不安定な挙動を示し、適切な形で存在するためには RFCS が必要という結果と一致する (Cann et al., 2001)。

2.3.3 *A. pernix* の細胞抽出液における ApeRFCS の検出

精製した組換え ApeRFCS を抗原としてウサギに注射し、ポリクローナル抗体を作成した。この抗体を用いてウエスタンブロッティングを行うことによって、*A. pernix* 細胞抽出液中の RFCS タンパク質を検出した。Fig.2-4 に示したように、精製した組換え ApeRFCS に相当する大きさのタンパク質が、細胞抽出液を用いた際にも検出された (Lane.2)。この結果は、ApeRFC 様のオープンリーディングフレームを持つ遺伝子が *A. pernix* 中で実際に発現していることを示している。また ApeRFCS の N 末端アミノ酸配列は、塩基配列から予想されたものと同一であった。

2.3.4 ApeRFCS 及び ApeRFC 複合体の ATPase 活性の測定

真核生物の RFC による PCNA の環状 DNA へのローディングには、ATP の加水分解が必要とされることが知られている。今回精製した ApeRFC タンパク質のホモログについても同様であるか確認するため、ApeRFCS 及び ApeRFC 複合体の ATP 加水分解をそれぞれ評価した (Fig.2-5)。

その結果、ApeRFC 複合体、ApeRFCS とともに ATPase 活性を示したが、ApeRFC 複合体の方が ApeRFCS よりもやや高い ATPase 活性を保持していた。また反応液中に ssDNA を加えると、

ApeRFCs ではそれほど効果がなかったが、ApeRFC 複合体では ATPase 活性が上昇した (Fig.2-5A 及び 2-5B)。また、ApePCNA2L と ApePCNA3 を等量反応系に加えると、若干ではあるがさらに加水分解活性が上昇した (Fig.2-5A 及び 2-5B)。

次に、反応液中に 3 種の ApePCNA を添加して ATPase 活性を評価した。予備実験で ApePCNA2L と ApePCNA3 を等量混合して使用しても ApePCNA3 単独で用いた際とそれほど変わらない結果が出ていたため、本実験においては ApePCNA1、ApePCNA2L 及び ApePCNA3 をそれぞれ使用した。その結果、ssDNA の存在下でいずれの ApePCNA も少しではあるが ATPase 活性を促進していた (Fig.2-5C)。ただ劇的な効果はなく、若干の上昇にとどまっていた。各 ApePCNA の中では、ApePCNA3 が比較的效果が高い傾向が見られた。DNA を加えない反応系でも同様に、わずかな上昇が見られたが、大きな効果はなかった (Fig.2-5D)。

そして、DNA 構造による促進効果への影響を評価するため、3 種類の DNA の存在下、ApeRFC 複合体の ATPase 活性を測定した。真核生物の RFC はプライマー末端を認識することが知られている (Lee et al., 1991, Tsurimoto and Stillman., 1991) ことから、部分的に 2 本鎖になったオリゴヌクレオチド (pri-DNA: d30-mer を M13ssDNA にアニールさせたもの) をテンプレートプライマーの代用として使用した。この実験の結果、ApeRFC の ATPase 活性への影響は、dsDNA よりも priDNA、そして ssDNA の順に効果が大きいことが示された (Fig.2-5E)。また、ApePCNA3 を共存させた反応系では、この順序に変化はなかったものの、priDNA の数値がやや ssDNA の値と近づき、ApePCNA がプライマー末端にアプローチしている可能性を予想させる結果であった (Fig.2-5F)。ただし今回の実験条件では、ssDNA と比べて pri-DNA の方が効果的であるという結果は得られなかった。

2.3.5 ApePolI 及び ApePolII の PCNA 依存的 DNA 合成への ApeRFC の影響

ApeRFCs 及び ApeRFC 複合体のクランプローディング活性を観察するため、*A. pernix* の PolI 及び PolII を用いたアッセイを実施した。まず M13mp18 環状 1 本鎖 DNA にプライマー配列をアニールさせた鋳型を用い、³H-TTP で標識したヌクレオチドの取込みアッセイを行った。ApeRFC の存在下及び非存在下で、ApePCNA1、ApePCNA2L、ApePCNA3 そして ApePCNA2L と ApePCNA3 を等量混合したものを加えて反応させた。その結果、ほぼすべての ApePCNA において、ApeRFC 複合体を加えることで取込み量が増加した (Fig.2-6)。

各 ApePCNA について見ると、ApePolI では単独で使ったときよりも ApePCNA2L と ApePCNA3 を混合して使用した系が、増加量が多い傾向であった (Fig.2-6A)。一方 ApePolII では、ApePCNA2L が ApeRFC 複合体を加えることで約 3 倍に取込み量が増大した (Fig.2-6B)。しかし ApePCNA2L と ApePCNA3 を混合した系においては ApeRFC 複合体の効果はわずかであった。

次に、ここで得られた RI 標識ヌクレオチドの取込み量の増大が、DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応の促進によるものであるか確認するため、環状 M13 1 本鎖 DNA を基質とし、合成された反応物質をアルカリ変性アガロースゲル電気泳動により分析した。前述したように、ApePolI と ApePolII のプライマー伸長活性はいずれも、強弱はあるものの 3 種の ApePCNAs によって促進される。本研究においては、この反応系に ApeRFC を加えることで PCNA 依存的合成がより一層促進されるか評価した。

その結果は、標識ヌクレオチドの取込み実験と同様に、大部分の ApePCNA による反応系でプライマー伸長反応に対する効果を示した (Fig.2-7)。特に ApePolI では、約 7250 の塩基長を持つ M13DNA の最後まで伸長したことを示すパネル最上部のバンド (実線矢印部分) が明白に増加して

おり、高い効果を示していると考えられる(Fig.2-7A)。

一方 ApePolII では、やはり ApeRFC 複合体を加えることでより伸長した生産物が増加しているものの、標識ヌクレオチドの取込み実験と同様にそれほど劇的ではなく、ApePolI と比べるとその作用は少ないと考えられる。

P. furiosus において、PolI 及び PolII の伸長活性を PfuPCNA は明確に促進するが、M13ssDNA を基質として用いると特定の部位で停止反応がおこり、そしてこの停止現象は、PfuRFC の添加により解除され、より長い生産物が合成されることが知られている(Cann et al., 2001)。本研究において *A. pernix* でも同様に、700~800 塩基対の長さの生産物が蓄積する現象が、特に ApePCNA2L において観察された(Fig.2-7A の Lane.2、点線矢印部分)。この ApePCNA2L の反応系に ApeRFC 複合体を添加すると、停止反応が劇的に解消するわけではないものの、ApePolI 及び ApePolII のいずれにおいても、より全長に近い生産物が合成されていた。また ApePCNA2L と ApePCNA3 を混合した系でも同様の傾向が見られた。これらの結果より ApeRFC 複合体は、クランプローディングを行う活性に加えて、停止状態にある DNA から ApePCNA をアンロードし、その後 DNA 鎖上で再度ポリメラーゼと PCNA を会合させ、より長い生産物を合成させる可能性が考えられる。DNA 上に PCNA をローディングする際、真核生物の RFC は通常 ATP を要求することが知られているが、この予想に反し、反応液中に ApeRFC 複合体を加えることで、ATP がなくても ApePCNA 依存性 DNA 合成が促進されるという結果を得た。

2.4 考察

A. pernix のゲノム中に、RFC ホモログと見られるタンパク質をコードする 2 つの遺伝子を見出し、その生産物が既知のクランプローダーと同様の生物学的性質を持っていることを示した。この ApeRFC 複合体は、*in vitro* において *A. pernix* の PolI 及び PolII の両方に対し PCNA 依存的に DNA 合成反応を促進する。そしてこの結果は、他の生物で示されてきた基本的な DNA 複製機構がアーキアにおいても保存されており、ApePolI と ApePolII とがともに *A. pernix* の細胞中の複製過程で働く酵素として機能することを示唆している。

真核生物の RFC は 4 つの小サブユニットと 1 つの大サブユニットから構成されている。これらのサブユニット間には、その N 末端側領域のアミノ酸配列にかなりの同一性が見られる。(Fig.2-8 及び 2-9)。各図中に、boxII から boxVIII までのモチーフに相当すると考えられる領域を矢印で示した。このような重複が存在するにもかかわらず、酵母においてはこれらの各 RFC サブユニットはすべて、生存に必須なタンパク質である(Cullmann et al., 1995、Gary et al., 1995、Li and Burgers, 1994a、Li and Burgers, 1994b、Noskov et al., 1994)。これに対し、アーキアの RFC は 2 種類のサブユニットから構成されている。アーキアの大サブユニットは、真核生物の RFC のサブユニットに見られるリガーゼモチーフ(boxI)を欠いており、この遺伝子の融合または欠失が、アーキアと真核生物の進化的な分離の際に生じた可能性が考えられる。このほか複製開始に関わる Cdc6 及び Orc1 も、RFC の類縁分子として報告されており、たいへん興味深い(Perkins and Diffley, 1998)。

DNA 合成における RFC の主要な役割は、真核生物の複製的 DNA ポリメラーゼによるプロセッシングな DNA 合成に際して DNA テンプレート上に PCNA をロードすることである。しかし、PCNA と RFC の相互作用については未だ明確にはなっていない部分が多い。PCNA は RFC の他に、細胞中で DNA に関する作用に必要な多くタンパク質と相互作用することが知られている。例えば、フラップエ

ンドヌクレアーゼ(Fen1)、DNA ミスマッチ修復に関わるタンパク質である MSH2 及び MLH1、ヌクレオチド除去修復を行うエンドヌクレアーゼ(XP-G)、サイクリンキナーゼ阻害剤(p21)、ヒトの DNA-シトシン-5 メチルトランスフェラーゼ(MCMT)そして DNA リガーゼ I(Tsurimoto, 1998) 等である。これらのタンパク質の多くは、PCNA と作用すると考えられる共通モチーフである PIP ボックスを保持している(Warbrick, 1998)。第一章で示したように、*A. pernix* においては、PolIII は PCNA と反応する PIP ボックスを持っているが、PolII は持っていない。興味深いことに、真核生物の RFC にははっきりとした PIP ボックスは見出されていない(Jonsson et al., 1998)。しかし既知のアーキアの RFCL においては、その最も C 末端側に高度に保存された PIP ボックスが存在し、また *P. furiosus* においては、PCNA が RFCL と反応することも確認されており(Cann et al., 2001)、PCNA と RFCL の PIP box 配列を有するペプチドの共結晶構造も解かれている(Matsumiya et al., 2002)。アーキアと真核生物におけるこのような相互作用様式の相違について解析することは、重要かつ非常に興味深いことである。

ATPase 活性については、ApeRFC 複合体と ApeRFCS の ATPase 活性を比較すると、複合体のほうが高かった。そして DNA や ApePCNA が存在すると、予想通り ApeRFCS よりも ApeRFC 複合体の活性の方がより促進される程度が大きかった。その際、ApePCNA が存在しない時には、ssDNA は ApeRFC 複合体の ATPase 活性を促進するが、ApeRFCS の活性は促進しなかった。また ApeRFCL は、単独で精製すると凝集してしまうため、それ自身が持つ ATPase 活性を測定することはできなかった。アーキアの ATPase 活性は、DNA 依存的な ATPase 活性を持つことが示されている真核 RFC サブユニットのうちの 3 種からなる複合体(p40、p36 及び p37) 部分に由来すると考えられている(Cai et al., 1997)。またこの部分複合体は、DNA 及び PCNA による促進効果を最大とするために、p140 との相互作用を必要とする(Cai et al., 1998、Podust et al., 1998)。これまでの研究から、*P. furiosus* の RFC 複合体と RFCS はともに、ssDNA 及び dsDNA と結合することが示されている。ヒト RFC(hRFC) の 4 種の小サブユニットはいずれも DNA と結合しないことから(Uhlmann et al., 1997)、サブユニット複合体は DNA に結合する必要があると考えられる。

ApeRFC の PCNA ローディング反応においては、*P. furiosus* において見られたのと同様に(Cann et al., 2001)、ATP が必要とされないという結果が得られた。通常、真核生物の RFC は、Pol δ による PCNA 依存的な DNA 合成においては ATP を要求する(Lee et al., 1991、Tsurimoto and Stillman, 1991)。本研究では、DNA 合成反応への ATP 添加については実施しなかったため、その効果については確認していない。

最後に、本研究で使用した ApeRFC 複合体は非常に安定な分子であり、そのため構造及び機能分析における実験材料として好適である。さらに言えば、この 2 種類のサブユニットからなるアーキアのクランプローダーは、アーキアと真核生物に共通する DNA 複製タンパク質の間の分子認識メカニズムを理解するために、重要な役割を持っている分子複合体であると考えられる。

第三章

3. 2 種の DNA ポリメラーゼ PolB1、PolB3 のコード領域の再検討

3.1 序論

アーキアの DNA ポリメラーゼが持つ機能については、1990 年代前半から、分析が続けられてきた。アーキア中に真核生物の複製酵素と類似したファミリー B 型ポリメラーゼをコードする遺伝子が発見されたことは驚きであり (Perler et al., 1992, Pisani et al., 1992, Uemori et al., 1993)、さらに別のアーキア *Pyrodicticum occultum* では、そのゲノム中に 2 種の別々の DNA ポリメラーゼが同定された (Uemori et al., 1995)。全ゲノム配列が報告されるまで、これらの発見はアーキアの DNA 複製系を研究する大きな動機付けとなり、アーキアと真核生物との間で複数のファミリー B 型 DNA ポリメラーゼから成る DNA 複製システムが保存されている可能性が考えられた。そして、いくつかのアーキアでは、1 種しかファミリー B 型の DNA ポリメラーゼが見つからず、その代わりにバクテリアや真核生物には存在しないアーキア特異的な DNA ポリメラーゼがゲノム中に見つかった (Ishino et al., 1998, Uemori et al., 1997)。最初に *P. furiosus* 中で発見された、DP1 と DP2 の 2 つのサブユニットから成る DNA ポリメラーゼは、予想されるアミノ酸配列を比較しても他のファミリーの DNA ポリメラーゼ中に保存されていないので、ファミリー D を提唱し (Cann and Ishino, 1999)、この酵素は PolD と呼ばれるようになった。今日では、クレンアーキオタ以外のすべてのアーキアのゲノム中に PolD の配列が確認されている (Ishino and Ishino, 2014)。アーキアにおける DNA ポリメラーゼの存在は、ほとんどのアーキアで 1 種の PolB と 1 種の PolD を持っており、例外的にクレンアーキオタのみが PolD を持たず複数の PolB を持っている。したがって、アーキアの DNA 複製機構の解明すべき課題の 1 つとして、クレンアーキオタの細胞中での複数の PolB の役割分担があげられる。

上記の *P. occultum* で 2 種のファミリー B 型 DNA ポリメラーゼが見いだされたことに続いて (Uemori et al., 1995)、*A. pernix* でも、細胞抽出液から複数の DNA ポリメラーゼが発見された。これらはいずれもファミリー B 型に相当するものであり、クレンアーキオタが複数の PolB を有するという 2 番目の例となった (Cann et al., 1999a)。遺伝子配列解析から、同じクレンアーキオタでも *S. solfataricus* のゲノム中に 3 種のファミリー B 型ポリメラーゼの遺伝子が見つかり、それぞれ PolB1、PolB2 並びに PolB3 と名付けられたが、活性の確認は 1 種のみ報告されていた (Edgell et al., 1997)。PolB1 と PolB3 は、よく保存されたエキソヌクレアーゼ及びポリメラーゼモチーフを有しており、活性型と予想されたが、PolB2 は活性に重要な残基が変異しており、不活化した遺伝子ではないかと予想された (Rogozin et al., 2008)。配列比較から、活性のある *P. occultum* 及び *A. pernix* の PolI 並びに PolII は、それぞれ PolB1 並びに PolB3 に相当し、ユーリアーキオタ中に存在する PolB は PolB3 であると考えられた (Rogozin et al., 2008)。クレンアーキオタ中の複数のファミリー B 型ポリメラーゼのそれぞれの機能については、一層の検討が必要である。

本研究の主題である *A. pernix* の DNA 複製因子の中で、2 種類のファミリー B DNA ポリメラーゼは当研究グループで発見した際に、従来の慣例に習って発見順にそれぞれ ApePolI 及び ApePolII と名付けて第一章、第二章では記載してきたが、上記のような *S. solfataricus* の DNA ポリメラーゼの例から、PolB1 と PolB3 と呼ぶほうが、他のクレンアーキオタと比較しやすいので、本章においては

ApePolI を ApePolB1、PolII を PolB3 と呼ぶことにする。本章では、ApePolB1 と ApePolB3 遺伝子のコード領域を見直し、翻訳開始コドンがより 5'側に存在する翻訳領域から産生されるタンパク質を調製し、実際に *A. pernix* 細胞内で産生されるタンパク質と比較して、ネイティブな ApePolB1、ApePolB3 と同じ大きさの組換え体を調製した。また精製した ApePolB1 及び ApePolB3 の性質を解析した。

3.2 材料と方法

3.2.1 シーケンス解析

今回使用した *A. pernix* のゲノム DNA 配列は、GenBank (accession number: BA000002) から得た。ApePolB1 と ApePolB3 のホモログは、query として *A. pernix* の PolB1 (APE0099) 及び PolB3 (APE2098.1) を用い、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースを参照した。クレンアーキオタのうち全ゲノム配列が判明している 71 種のうち、24 種の PolB1 と PolB3 の ORF の上流 DNA 配列から、N 末端配列のうち可能性のある開始コドン (GTG 又は TTG) について調べた。MAFFT online service (Katoh et al., 2017) を活用するとともに、保存されているモチーフについては、マニュアルで確認した。

3.2.2 *A. pernix* の DNA ポリメラーゼ遺伝子のクローン化

ApePolB1 の N 末端配列が異なる PolB1L、PolB1M 及び PolB1S、ApePolB3 の N 末端配列が異なる PolB3L 及び PolB3S を、それぞれのプライマー対 PolB1LF/PolB1R、PolB1MF/PolB1R、PolB1SF/PolB1R、PolB3LF/PolB3R 並びに PolB3SF/PolB3R を使用し *A. pernix* のゲノム DNA 配列から PCR 反応によって増幅させた (Table 3-1 参照)。

P. furiosus の DNA ポリメラーゼ B (PfuPolB) は、以前に報告した方法で調製した (Komori and Ishino, 2000)。PfuPolB を用いて各配列を増幅し、制限酵素 NdeI 及び NotI (New England Biolabs 社製) で切断した。その後、発現ベクターである pET-21a(+)ベクター (Novagen 社製) の同じ制限切断部位に、T4 DNA リガーゼ (New England Biolabs 社製) を用いて連結した。

3.2.3 組換えタンパク質の調製

得られた各発現ベクターを用い、コンピテントセル *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL (Agilent 社製) 中で組換えタンパク質を生産させた。形質転換した大腸菌を、50 µg/mL のアンピシリン及び 34 µg/mL のクロラムフェニコールを含む LB 培地を用いて 37°C で OD 600nm が 0.5 になるまで培養した。その後最終濃度が 0.5 mmol/L になるよう Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し、25°C で 18 時間培養した。培養液を回収し、0.5 mol/L 濃度の NaCl を含む buffer A (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA 及び 10% glycerol) 中で超音波破碎した。得られた DNA ポリメラーゼは、ウエスタンブロッティングにより確認した。

ApePolB1L と ApePolB1S については、可溶性画分を 60°C で 20 分加熱処理した。耐熱性の画分を 0.15% のポリエチレンイミン溶液で処理し、核酸成分を除いた。得られた可溶性画分は、80% 飽和硫酸アンモニウムを用いて沈澱させた。ここに 1.4 mol/L 濃度の硫酸アンモニウムを含む Buffer A を加え、HiTrap Phenyl HP カラム (GE Healthcare 社製) を用いてクロマトグラフィーを行った。グラジエントは 1.4 から 0 mol/L の硫酸アンモニウムを使用した。

ApePolB1を含む画分は、0.1 mol/L の NaCl を含む buffer B (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.6、0.5 mmol/L DTT、0.1 mmol/L EDTA 及び 10% glycerol) に対して透析した。この透析後の溶液は、HiTrap Q HP カラム (GE Healthcare 社製) を用いてクロマトグラフィーを行った。グラジエントは、0.1 から 1 mol/L の NaCl を含む Buffer B を使用した。

ApePolB3L 及び ApePolB3M では、可溶性画分に対し 75°C で 20 分加熱処理を行った。耐熱性の画分に 0.15% 濃度のポリエチレンジアミン溶液を加えて核酸成分を除いた。可溶性画分に 80% 飽和硫酸アンモニウムを用いて沈澱させた。沈澱に 0.1 mol/L の NaCl を含む Buffer A を加えたのち透析を行い、HiTrap SP HP カラム (GE Healthcare 社製) を用いてクロマトグラフィーを行った。グラジエントは 0 から 1 mol/L の NaCl を含む Buffer A を使用した。タンパク質濃度は、280 nm の吸光度を測定することで計算した。ApePolB1L、ApePolB1S、ApePolB3L 及び ApePolB3S のそれぞれの理論吸光係数は、121590、118610、126630 並びに $125140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とした。いずれも、トリプトファンとチロシンの含量に基づくものである (Gasteiger et al., 2003)。

3.2.4 ウェスタンブロッティング

抗 PolB1 及び抗 PolB3 抗体は、組換え体の PolB1S と PolB3S とをウサギに免疫して調製した。A. *pernix* K1 株はこれまでに報告された方法で培養した (Sako et al., 1996)。菌体溶液 0.1 g は、0.5 mol/L NaCl 及び 1 mmol/L EDTA を含む 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 2.0 mL 中で超音波破碎した。細胞破碎液及び粗抽出した組換えタンパク質を 12% 濃度の SDS-PAGE に用いた。この際、それぞれのバンドを十分分離するため通常より長い時間をかけ泳動した。泳動度のゲルからタンパク質を PVDF 膜 (Bio-Rad 社製) 上に転写し、抗 PolB1 及び抗 PolB3 抗体と反応させた。その後 Immobilon (Millipore 社製) と反応させ、LAS-3000mini イメージアナライザー (富士フイルム社製) で視覚化した。

3.2.5 ヌクレオチド取込みアッセイ

ヌクレオチドの取込みアッセイは、これまでに述べられた方法で実施した (Uemori et al., 1995)。その反応は、以下の組成の溶液中に 20 nmol/L 濃度の DNA ポリメラーゼを用いて 70°C 及び 50°C で実施した。その反応液組成は、25 mmol/L Tris-HCl (ApePolB1 は pH 8.6、ApePolB3 は pH 8.0)、60 mmol/L NaCl、10 mmol/L 硫酸アンモニウム、0.1% Triton X-100、0.1 mg/mL BSA、2 mmol/L MgCl_2 、2 mmol/L DTT、0.2 mmol/L 各 dNTP、10 $\mu\text{Ci/mL}$ [methyl- ^3H]dTTP 及び 0.2 mg/mL 活性化 salmon sperm DNA である。これらを反応させた後、反応液 10 μL を DE81 フィルター (GE Healthcare 社製) 上にスポットした。その後フィルターを 5% 濃度の Na_2HPO_4 溶液で洗浄し、乾燥させた。RI の取込み量を、シンチレーションカウンター (Aloka 社製) で測定した。この際、酵素を使用しない反応系を陰性対象として設定した。

3.2.6 PCR

種々の PCR 反応の条件については、テンプレートとして λ ファージ DNA (タカラバイオ社製)、プライマーとして 5'- dGAGTTCGTGT CCGTACAAC TGGCGTAATCA TGGCC -3' 及び 5'- dCTTTTCAGCC TGGCCCTTTC CTTTACC -3' を用いて、約 1000 塩基対の増幅産物ができるように設計した。

ApePolB における基本 PCR 反応液として、最終液量 50 μL 中に、100 mmol/L Tris HCl, pH 8.8、

2 mmol/L MgSO₄, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA, 0.2 mmol/L dNTPs 及び 0.4 µmol/L 各プライマーを含むように調製した。また PfuPolB の PCR 反応液は、最終 50 µL 中に、20 mmol/L Tris HCl, pH 8.8, 2 mmol/L MgSO₄, 10 mmol/L KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA, 0.2 mmol/L dNTPs 及び 0.4 µmol/L 各プライマーを含むように調製した。この他一部必要に応じて微調整した。PCR の温度サイクルは、98℃で変性(10 秒)、55℃でアニーリング(30 秒)そして 72℃で伸長(90 秒)することで実施した。増幅して得られた反応液は、0.8%濃度のアガロースゲル電気泳動し、臭化エチジウム溶液で視覚化した。PCR 時のフィデリティアッセイは、lacZα 遺伝子を持つ改良型 pTV119N プラスミド(タカラバイオ社製)を用いて行った。このプラスミドは、lacZα 遺伝子の両側に NcoI 及び XhoI の制限切断配列を導入し、元々あった NcoI 配列を NdeI 配列に置換えたものである。こうして作製したプラスミドを pTV119NNX とした。この pTV119NNX 5 ng をテンプレートとし、各 0.4 µmol/L 濃度の NF プライマー(5'-dCTGGCACGAC AGGTTTCCAT GGTGG -3') 及び XR プライマー(5'-dCGTCATCACC GAAACGCTCG AGACG -3')を用いて 483 塩基対の標的配列を増幅した。プライマー配列のうち、NcoI 及び XhoI 認識配列を下線で示した。PCR 反応は、上記の基本型から温度サイクルを 98℃で変性(10 秒)、56℃でアニーリング(20 秒)そして 72℃で伸長(30 秒)に変更し、いずれも 20 nmol/L 濃度の ApePolB3 及び PfuPolB を用いて 20 サイクル実施した。得られた PCR 産物は NcoI 及び XhoI で処理し、pTV119NNX 中に挿入した。組み換えたプラスミドで *E. coli* JM109 株を形質転換し、50 µg/mL アンピシリン、1 mmol/L IPTG 及び 100 µg/mL X-gal を含む LB 寒天培地に広げた。白色及び明るい青のコロニーを変異型とし、一方濃い青のコロニーを、正常型としてそれぞれカウントした。増幅領域中に、lacZα として発現し機能する 345 塩基対の断片を確認した。陰性コントロールとして、pTV119NNX の同じ領域の配列を、再度連結したものを用いた。これらのうち白色のコロニーをランダムに選び、NF 及び XR プライマーを用いて挿入断片の確認を行った。

3.2.7 エキソヌクレアーゼアッセイ

プライミング DNA には、2 mmol/L MgCl₂ を含む 20 mmol/L-Tris HCl, pH 8.0 中で、5'末端を Cy5 ラベルした 5'-dCGAACTGCCT GGAATCCTGA CGACATGTAG CG -3' 及び 5'-TGAGGTGATC GTTCGCTACA TGTCGTCAGG ATTCCAGGCA GTTCG -3' の各プライマーを使用して調製した。ApePolB3 及び PfuPolB のヌクレアーゼ反応は、それぞれの PCR 反応液中で、10 nmol/L 濃度の基質を用い、dNTPs を入れない系で実施した。この反応液を 70℃でインキュベートした後、等量の停止液(98% ホルムアルデヒド、20 mmol/L EDTA 及び 0.01% orange G)を加えて反応を停止し、8 mol/L 尿素を含む TBE 緩衝液を用いて 12%-PAGE を行った。得られたゲルを Typhoon Trio+イメージアナライザー(GE Healthcare 社製)で視覚化した。

3.3 結果

3.3.1 ApePolB1 及び ApePolB3 のオープンリーディングフレームについて

A. pernix の 2 種のファミリー B DNA ポリメラーゼが同定されたのはこれまでの研究から、ファミリー B DNA ポリメラーゼに保存されているモチーフ A (SLYPSII) 及びモチーフ C (VIYGDTD) に基づき設計したプライマーを用いた PCR 増幅により、遺伝子断片をクローニングしたことから始まる。*A. pernix* のゲノム DNA から約 400 塩基対の断片を増幅し、そこから各酵素遺伝子の全長をクローニングした

(Cann et al., 1998)。開始コドンとして ATG を想定し、コーディング領域を推定した。その後、*A. pernix* の全ゲノム配列が発表され、約 2700 のオープンリーディングフレーム(以下 ORF)を含むことが予測された(Kawarabayasi et al., 1999)。しかし、その後 ORF の再検討がなされ、2000 年に 1871 個の ORF に減少した(Natale et al., 2000)。更に、*A. pernix* では ATG 以外の開始コドンの使用頻度が高いことがわかり、1610 個の ORF が存在すると訂正された(Guo et al., 2004)。そして、2 次元ゲル電気泳動や質量分析を用いたプロテオーム解析より、704 種のタンパク質が解析された(yamazaki et al., 2006)。この研究では、翻訳開始コドンとして、これまでに知られていた ATG (28%) 及び GTG (20%) に比べて、より多い 52% のタンパク質が TTG コドンから開始されることがわかった。しかし、これらの研究報告には、上記 2 種の DNA ポリメラーゼに関する情報は含まれていなかったため、開始コドンの候補が複数あり、アノテーションの精度が向上した後も、依然として 2 種の DNA ポリメラーゼに対する構造遺伝子は確定していなかった。そこで、ApePolB1 及び ApePolB3 の上流の配列を調査し、ApePolB1 について、元々報告されていた ATG コドンから始まる配列と同じフレーム内に、Fig.3-1 で示した TTG と GTG を見出した。TTG 及び GTG を開始コドンとすると、ORF はそれぞれ 58 及び 36 アミノ酸長くなる。一方 ApePolB3 についても、元々の ATG から始まる ORF と同じフレーム内に、19 アミノ酸長くなる TTG コドンが見つかった。アミノ酸配列によるアライメントでは、PolB1 のホモログの N 末端部分の長さは多様性を持つ傾向があるが、N 末端が長くなった ApePolB1 は、近縁の種のホモログとはかなり一致していると考えられる(Fig.3-2)。

3.3.2 *A. pernix* 細胞抽出液中の Native PolB1 及び PolB3 の同定

ApePolB1 及び ApePolB3 に対する抗体は、精製した ApePolI 及び ApePolII タンパク質を用いて作製したものを用いた。*A. pernix* の細胞中の PolB1 及び PolB3 をウエスタンブロッティングにより検出した。上記のように、ApePolB1 には 3 種、ApePolB3 には 2 種の ORF が予想された。これらの配列に対する遺伝子をクローニングし、発現させた *A. pernix* の各 DNA ポリメラーゼを、それぞれ PolB1L (long)、B1M (middle)、B1S (short)、B3L (long) 及び B3S (short) とした。大腸菌から得た細胞抽出液を *A. pernix* の細胞抽出液と比較するため、これらを電気泳動し、ウエスタンブロッティングによりそのバンドを検出した。Fig.3-3 に示したように、バンドのサイズとして *A. pernix* の細胞内画分と一致したのは、組換え体の PolB1L 及び PolB3L であった。この結果から、ネイティブな ApePolB1 及び ApePolB3 は、評価した中で最も長い ORF にコードされた分子として発現されていると考えられる。

3.3.3 予測された ORF 由来の組換えタンパク質の精製

それぞれの ORF から得られるタンパク質の性質を比較するために、それぞれの DNA ポリメラーゼの組換え体タンパク質の精製を実施した。Fig.3-3 に示したように、各 ORF を持つ 5 種類のタンパク質を大腸菌で発現させたが、いずれも可溶性が低く、特に PolB1M については、全く可溶性画分中に得ることができなかった。そのため、PolB1L、PolB1S、PolB3L 及び PolB3S について精製し、Fig.3-4 に示したようにそれぞれ精製画分として調製した。

3.3.4 比活性の比較

精製した ApePolB1 及び ApePolB3 の組換えタンパク質の DNA ポリメラーゼとしての活性を、ヌクレオチド取込みアッセイ法により比較した。Fig.3-5 に示したように、ApePolB1 及び ApePolB3 とともに、

N 末端の長さによる差はそれほど大きくなかった。以上のことから、今回 N 末端に付加した領域は、各 DNA ポリメラーゼの酵素活性に直接の影響を与えていないことが示唆された。

3.3.5 耐熱性の比較

延長した N 末端領域の機能を調べるため、ApePolB1 及び ApePolB3 の長短の酵素の耐熱性を比較した。PolB1L と PolB1S に関しては、耐熱性はほぼ同様に推移し、80℃で 30 分加熱することで、いずれもその活性はほぼ消失した (Fig.3-6A)。一方 PolB3L は、非常に高い耐熱性を示し、100℃で 30 分加熱後もほぼその活性を保持していた。これに対し PolB3S では、温度を上げると徐々に活性が下がる結果となった (Fig.3-6B)。以上のことから、ApePolB3 の N 末端の 19 アミノ酸配列は、タンパク質の安定な構造形成に非常に重要であることがわかった。

3.3.6 耐塩性について

上記のように PolB3L が非常に高い耐熱性を示したため、この DNA ポリメラーゼが PCR 反応に使用可能であるか評価した。実用的に PCR に使用されている DNA ポリメラーゼも含めて、一般的に DNA ポリメラーゼは *in vitro* 反応において NaCl 濃度の増加に伴い活性は低下し、顕著に塩濃度に感受性が高い。PolB3L の塩濃度感受性を調べるため、*P. furiosus* の PolB (PfuDNA ポリメラーゼとして知られ市販されている、以下 PfuPolB) と酵素活性を比較したところ、PolB3L はより NaCl 濃度が高い条件でも活性を示し (Fig.3-7)、PolB3L は PfuPolB よりも耐塩性が高いことが示された。

3.3.7 PolB3L の PCR 性能

上記の結果は、PolB3L が PCR 酵素としてのポテンシャルを有し、より精製度の低い試料においても利用できる可能性を示唆している。約 1000 塩基対の長さの DNA 断片を PCR 増幅する系で、PolB3L と PfuPolB とを比較した。Fig.3-8A 及び Fig.3-8B より、PolB3L は 0~100 mmol/L 濃度の NaCl 及び 0~120 mmol/L 濃度の KCl の存在下、標的 DNA を増幅することができた。一方、PfuPolB では、NaCl 及び KCl いずれも 40 mmol/L 濃度で明確に増幅反応が阻害された。更に PolB3L はヘパリンに対しても、PfuPolB より耐性が高いことがわかった (Fig.3-8C)。またプラスミド中に変異が入る頻度について、*lacZα* 遺伝子の増幅により評価した。見かけの変異導入頻度は、ApePolB3 及び PfuPolB でそれぞれ「 $2.6 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ 」及び「 $1.3 \pm 1.6 \times 10^{-6}$ 」であった (Table 3-2)。

3.3.8 PolB3L のエキソヌクレアーゼ活性

PolB3L と PfuPolB の変異頻度の明らかな差について詳細に解析するため、これらの酵素の 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を、5'末端ラベルしたプライマー及び基質となるテンプレートを用いてそれぞれの PCR 条件で比較した。Fig.3-9 に示すように、20 nmol/L 濃度の PfuPolB では 1 分で基質が分解された。これに対し、同じ濃度の PolB3L では、5 分間反応させてもそれほど分解されなかった。この結果は、上記の酵素間の変異頻度の差とよく一致していた。PolB3L にもエキソヌクレアーゼモチーフがよく保存されている (Fig.3-10B 及び Fig.3-2, Blanco et al., 1991) にもかかわらず PfuPolB よりもその酵素活性が非常に低い理由については、現時点ではよくわかっていない。

3.4 考察

高度好熱性クレンアーキオタである *A. pernix* K1 株は、1996 年に鹿児島県で単離され (Sako et al., 1996)、95°C でも好氣的に生育できることから、そのゲノム DNA の複製メカニズムが注目された。以前、2 種の DNA ポリメラーゼについて、開始コドンとして ATG から始まる最長の ORF が組換え体タンパク質として考えられた (Cann et al., 1999a)。これらをコードする遺伝子の翻訳開始コドンについて検討し、より正確に構造遺伝子を決定することを試みた。アーキアでは転写及び翻訳シグナルの配列に大きな多様性がある。バクテリアと比較して、多くのアーキアではその Shine-Dalgarno (以下 SD) 配列に多様性が大きく、また開始コドンとして GUG 及び UUG がよく使われる。また *A. pernix* では、構造遺伝子の 5' 側上流に 15 から 4 塩基の間に SD 配列が存在しており、更に 3 塩基前は G であるケースがかなり多い (Torarinsson et al., 2005)。このような特徴は、Fig.3-1 で示した 2 種の遺伝子についても同様である。*A. pernix* K1 株は、上記のように翻訳開始コドンとして TTG が最も頻繁に現れる最初の報告例であり、2 種の DNA ポリメラーゼについても同様である。アーキアの正確な翻訳開始に関する分子機構については明らかになっておらず、*A. pernix* で TTG が最も開始コドンとして頻度が高い理由は、依然として興味深い問題である。その解明には、開始 tRNAi の単離及び解析が必要である。

ApePolB1 や ApePolB3 の N 末端領域がどのような機能を持っているかについて考察した。PolB1 では、PolB1L と PolB1S で比活性に差は見られなかった。また PolB3L と PolB3S についても、N 末端領域は酵素活性に直接的な影響はもたらさなかった。今回大きな違いが出たのは PolB3 の耐熱性で、ATG から始まる ORF (PolB3S) と比べて N 末端が 19 アミノ酸長いもの (PolB3L) では、大幅な耐熱性の向上が見られた。この差は、N 末端の 19 アミノ酸が PolB3 のフォールディングの安定化に寄与していることを示唆している。N 末端アミノ酸領域の安定性への寄与について、これまでに立体構造が判明している *Pyrobaculum calidifontis* 及び *Pyrococcus abyssi* の DNA ポリメラーゼ B3 を参照し考察した。クレンアーキオタに属する *P. calidifontis* の PolB3 の N 末端領域 (Fig.3-11A 及び B 中紫色で示す) は、その構造中で分子の内部に位置していると見られる。またユーリアーキオタに属する *P. abyssi* の PolB3 に関しても、N 末端領域 (Fig.3-11A 及び C 中紫色で示す) は分子内部に位置していると考えられ、いずれの DNA ポリメラーゼも N 末端領域がフォールディングに寄与している可能性が高い。従って *A. pernix* の PolB3 においても、同様に N 末端領域が分子内部に存在していると考えられ、安定性への寄与が期待できる。以上のことから、今回 PolB3L で延長された N 末端領域の 19 残基がフォールディングの安定性に重要であると予測する。

アーキアのファミリー B 型ポリメラーゼは、ウラシルポケットと呼ばれるテンプレート DNA 中のウラシルの 4 塩基手前で合成を止めてしまう機能 (いわゆるリード-アヘッド機能) を持つことが知られている (Fogg et al., 2002)。ウラシルポケット中のアミノ酸配列は、これらの DNA ポリメラーゼにおいて高度に保存されている。特にリード-アヘッド機能に重要とされ、よく保存されているチロシン残基は、PolB3L には存在するが、PolB3S 中には見られない (Fig.3-10A)。このことから、*A. pernix* 中では PolB3 は、PolB3L の形状で機能していると考えられる。

PolB1 ホモログの N 末端領域は、その長さについて特に多様性があり (Fig.3-2)、その機能は未だ解明されていない。最近の研究で、*S. solfataricus* PolB1 は 2 種の協働するタンパク質 PBP1 及び PBP2 の同定により、ヘテロ 3 量体酵素であることが判明した (Yan et al., 2017)。この PolB1 複合体は、PolB1 単独よりも耐熱性が高い。また構造解析の結果より、PBP1 は N 末端領域及びエキソヌクレア

ーゼ領域に相互作用すること、一方 PBP2 は C 末端領域に存在する Thumb 領域に相互作用することが示された。この報告において、*A. pernix* もゲノム中に PBP1 及び PBP2 のホモログを持つことが示されている。*A. pernix* の PolB1 が、それほど耐熱性が高くないことは、PBP1 及び PBP2 によりカバーされるかもしれない。しかし、著者は論文に記載されているようなホモログを同定できない。少なくとも、明らかに PBP1 及び PBP2 のホモログであると言える配列は *A. pernix* には無いと言える。PolB1 の N 末端配列が多様性を持っていることもあり、*S. solfataricus* のホモログとの相同性について明らかではない。更にこの酵素の相当長い N 末端領域が他のタンパク質等と相互作用する役割を持っている可能性もある。

DNA ポリメラーゼは遺伝子工学の分野において最も広く使用されている酵素である。特に耐熱性 DNA ポリメラーゼは、PCR 関連技術への応用について、非常に有用である (Ishino and Ishino, 2014, Terpe et al., 2013)。PCR 用酵素には高い耐熱性が求められ、中程度の好熱菌由来ではなく、非常に高い耐熱性を持つ超好熱菌か高度好熱菌由来の DNA ポリメラーゼだけがその目的のために使用できる。これまでユーリアーキオタに属する好熱菌微生物由来の DNA ポリメラーゼが多く市販されてきたが、クレンアーキオタの DNA ポリメラーゼについては、*Pyrobaculum* 及び *Ignicoccus* の酵素が適応可能であると報告されている (Ali, 2011, Kahler and Antranikian, 2000, Seo et al., 2014) もの、実際に使用されている例はない。ApePolB3L は十分 PCR 反応に使用できる耐熱性を有し、しかも塩やヘパリンにも耐性が高い。これらの特徴は、環境由来の試料や臨床検体のような多くの不純物を含むサンプルから標的 DNA を増幅する場合に、特に大きな利点となり得る。耐塩性等について、DNA ポリメラーゼの活性領域周辺のアミノ酸配列を比較した。エキソヌクレアーゼ及び DNA ポリメラーゼ活性に直接関わる配列に大きな差が見られなかった (Fig.3-10B) ため、更に活性に関わるフォークトポイント及びフィンガーサブドメイン領域 (Hashimoto et al., 2001) についてもアミノ酸配列を比較した。DNA テンプレートへの結合に関連するフォークトポイント領域では、*A. pernix* を含むクレンアーキオタの DNA ポリメラーゼにおいては、ユーリアーキオタで見られる Arg 残基があまり保存されていなかった (Fig.3-12A)。一方フィンガーサブドメイン領域については、塩基性残基はよく保存されていた (Fig.3-12B) が、より高い耐塩性等が見られるほどの大きな変化はないと考えられる。以上より、現時点では ApePolB3L に耐塩性並びに耐ヘパリン性をもたらす要因は、特定できていない。

ApePolB3L について簡易なフィデリティ評価を行ったところ、最も正確な PCR 酵素の 1 つである PfuPolB よりも、正確性が低いことがわかった。しかし、*in vitro* での DNA ポリメラーゼのフィデリティは反応条件に依存することが多く、条件次第ではより正確性が増す可能性もある。更に DNA タイピングに必要な情報は、マーカー遺伝子を正確な鎖長で増幅することであるため、塩基の誤導入による影響はそれほど問題にならない。以上のことから、ApePolB3L の不純物に対する耐性の高さは、医療分野での診断目的の PCR 酵素としての使用に大きな可能性を持つことが予想され、その実用化が期待される。

結論

本研究は、クレンアーキオタに属するアーキアである *A. pernix* をモデルとして、DNA 複製に関わるポリメラーゼ複合体の機能解明を目指したものである。その中で特に、*A. pernix* のゲノム中に見出された3種のPCNA(第一章)及び2種のRFC(第二章)をクローン化し、大腸菌中で発現させ、精製した標品を用いてDNAポリメラーゼ複合体の機能解析をおこなった。また2種のDNAポリメラーゼのN末端領域を延長したものが、その性質について与える影響(第三章)についても考察した。

A. pernix のゲノム中に見られた3種のPCNA(PCNA1、PCNA2 及び PCNA3)について解析し、以下のことを明らかにした。

- ・ゲノム中に存在する3種のPCNAに対する遺伝子をクローニングし、発現させて精製した。この標品を用いて抗体を作成するとともに、その生化学的性質解析を行った。作製した抗体を用いてウェスタンブロッティングを実施したところ、いずれのPCNAも*A. pernix* の細胞抽出液中に検出され、クローニングした遺伝子が*A. pernix* 細胞中で発現していることが確認された。
- ・得られたPCNA標品を*A. pernix* の2種のDNAポリメラーゼと反応させたところ、3種とも両DNAポリメラーゼのプライマー伸長活性を促進したことより、効率は異なるものの、3種のPCNAはそれぞれ単独で3量体環状構造を形成して機能することが示唆された。
- ・各抗体を用いてPCNAの免疫沈降反応を実施すると、ApePCNA1とApePCNA2のペア及び、ApePCNA2とApePCNA3のペアが、相互作用していることが判明した。すなわち、ヘテロ複合体として機能することも可能であることが示された。
- ・ApePCNA2とApePCNA3を共存させてDNAポリメラーゼ反応を行うと、それぞれ単独の時よりも著しくプライマー伸長反応を増大させた。その効果は、ApePolIIの方がApePolIよりも顕著であった。PCNA複合体の組み合わせと対応する分子の間に選択性がありそうである。
- ・ApePCNA2のN末端が16アミノ酸短い分子では、ApePCNA1とは相互作用するが、ApePCNA3とは相互作用しなかった。このことより、ApePCNA2のApePCNA3との作用部位はN末端付近にあることが予想された。PCNA2のORFとして予想したもののうち、長いほうが実際に*A. pernix* 細胞中で産生される正しいタンパク質に対するものであると考えられる。

A. pernix のゲノム中に見出されたRFCホモログをコードする遺伝子をクローニングし、発現させて精製したタンパク質の機能解析を行って、以下のような知見を得た。

- ・2種のRFCタンパク質(RFCS、RFCL)を精製して得られたApeRFC複合体はATPase活性を持ち、ssDNAを加えると、その活性が増加した。一方PCNAを加えた時には、大きな変化はみられなかった。
- ・DNAポリメラーゼのPCNA依存的DNA鎖伸長反応にApeRFC複合体を添加したところ、ApePolI、ApePolII どちらの場合も、伸長反応は促進された。

2種のDNAポリメラーゼのN末端領域について新たなORFの候補を探り、以下のことを明らかにした。

- ・ApePolB1及びApePolB3とも、N末端アミノ酸を延長しても、その比活性については大きな差は認

められなかった。

- PolB3L は PolB3S に比べて、大幅に耐熱性の向上が見られ、延長された N 末端領域がタンパク質の安定化に起用していることを示している。
- PolB3L の耐熱性は PCR 酵素として利用可能であり、さらに現在市販されている既存の PCR 酵素よりも耐塩性が高く、ヘパリンに対してもより耐性を示したことより、不純物を多く含む試料からの目的 DNA 増幅に適した PCR 酵素として、実用化が期待される。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 生物機能分子化学講座 蛋白質化学工学(現生物化学)分野 石野良純教授、石野園子准教授に深く感謝いたします。

博士論文をまとめるにあたり、ご指導いただきました九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 生物機能分子化学講座 生物物理化学分野 角田佳充教授、西本悦子准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、多大なるご協力を賜りました九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門 生物機能分子化学講座 蛋白質化学工学(現生物化学)分野の山上健助教、松川博昭博士、今井奈美子氏、金田敏枝氏、南雲吉代氏に厚く御礼申し上げます。

大学院博士課程在籍中、蛋白質化学工学研究室の皆様にはたいへんお世話になりましたこと、感謝いたします。

引用文献

- Ali, S. F., Rashid, N., Imanaka, T., and Akhtar, M.** 2011. Family B DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*: cloning, characterization and PCR application. *J. Biosci. Bioeng.* **112**: 118–123.
- Bessman, M. J., Kornberg, A., Lehman, I. R., and Simms, E. S.** 1956. Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **21**: 197–198.
- Blanco, L., Bernad, A., Blasco, M. A., and Salas, M.** 1991. A general structure for DNA-dependent DNA polymerases. *Gene* **100**: 27–38.
- Bowman G. D., E. R. Goedken, S. L. Kazmirski, Mike O'Donnell and J. Kuriyan.** 2005. DNA polymerase clamp loaders and DNA recognition. *FEBS Letters* **579**: 863–867.
- Braithwaite, D. K., and Ito, J.** 1993. Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **21**: 787–802.
- 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., et al.** 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.
- Cai, J., E. Gibbs, F. Uhrmann, B. Phillips, N. Yao, M. O'Donnell, and J. Hurwitz.** 1997. A complex consisting of human replication factor C p40, p37, and p36 subunits is a DNA-dependent ATPase and an intermediate in the assembly of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* **272**: 18974-18981.
- Cai, R. L., Y. Yan-Neale, M. A. Cueto, H. Xu, and D. Cohen.** 2000. HDAC1, a histone deacylase, forms a complex with Hus1 and Rad9, two G2/M checkpoint Rad proteins. *J. Biol. Chem.* **275**: 27909-27916.
- Cann, I. K. O., K. Komori, H. Toh, S. Kanai, and Y. Ishino.** 1998. A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Eukaryota possess a distinct DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14250-14255.
- Cann, I. K. O., S. Ishino, N. Nomura, Y. Sako, and Y. Ishino.** 1999a. Two family B DNA polymerases from *Aeropyrum pernix*, an aerobic hyperthermophilic crenarchaeota. *J. Bacteriol.* **181**: 5984-5992.
- Cann, I. K. O., and Y. Ishino.** 1999. Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics.* **152**: 1249-1267.

- Cann, I. K. O., S. Ishino, I. Hayashi, K. Komori, H. Toh, K. Morikawa, and Y. Ishino.** 1999b. Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* **181**: 6591-6599.
- Cann, I. K. O., S. Ishino, M. Yuasa, H. Daiyasu, H. Toh, and Y. Ishino.** 2001. Biochemical analysis of replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **183**: 2614-2623.
- Caspari, T., M. Dahlen, G. Kanter-Smoler, H.D. Lindsey, K. Hofmann, K. Papadimitriou, P. Sunnerhagen, and A. M. Carr.** 2000. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. *Mol. Cell. Biol.* **74**: 1254-1262.
- Croocker, P. C., Y. Sako, and A. Uchida.** 1999. Purification and characterization of an intracellular heat-stable proteinase (pernilase) from the marine hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *Extremophiles.* **3**: 3-9.
- Cullman, G., K. Fien, R. Kobayashi, and B. Stillman.** 1995. Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4661-4671.
- Edgell, D. R., and W. F. Doolittle.** 1997. Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins. *Cell* **89**: 995-998.
- Edgell, D.R., Klenk, H.P., and Doolittle, W.F.** 1997. Gene duplications in evolution of archaeal family B DNA polymerases. *J. Bacteriol.* **179**: 2632-2640.
- Fogg, M. J., Pearl, L. H., and Connolly, B. A.** 2002. Structural basis for uracil recognition by archaeal family B DNA polymerases. *Nat. Struct. Biol.* **9**: 922-927.
- Forterre, P., C. Elie, and M. Kohiyama.** 1984. Aphidicolin inhibits growth and DNA synthesis in halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **159**: 800-802.
- Gary, S. L., and M. J. Burgers.** 1995. Identification of the fifth subunit of *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4986-4991.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A.** 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3784-3788.
- Gulbis, J. M., Z. Kelman, J., M. O'Donnell, and J. Kuriyan.** 1996. Structure of the C-terminal region of p21 (WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* **87**: 297-306.

- Guo, F. B., Wang, J., and Zhang, C. T.** 2004. Gene recognition based on nucleotide distribution of ORFs in a hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* **11**: 361–370.
- Hashimoto, H., M. Nishioka, S. Fujiwara, M. Takagi, T. Imanaka, T. Inoue and Y. Kai.** 2001. Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus Kodakaraensis* KOD1. *J. Mol. Biol.* **306**: 469-477.
- Henneke, G., D. Flament, U. Hubscher, J. Querellou, and J. P. Raffin.** 2005. The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *J. Mol. Biol.* **350**: 53-64.
- Ishino, S., and Ishino, Y.** 2006. Comprehensive Search for DNA Polymerase in the Hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **25**: 681-691.
- Ishino, S., and Ishino, Y.** 2013. *DNA Polymerases and DNA Ligases*. Heidelberg: Springer.
- Ishino, S., and Ishino, Y.** 2014. DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field. *Front. Microbiol.* **5**: 465.
- Ishino, Y., T. Tsurimoto, S. Ishino, and I. K. O. Cann.** 2001. Functional interactions of an archaeal sliding clamp with mammalian clamp loader and DNA polymerase δ . *Genes Cells* **6**: 699-706.
- Jarvis, T. C., L. S. Paul, and P. H. von Hippel.** 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.
- Jeruzalmi, D., O. Yurieva, Y. Zhao, M. Young, J. Stewart, M. Hingorani, M. O'Donnell, and J. Kuriyan.** 2001a. Mechanism of processivity clamp opening by the delta subunit wrench of the clamp loader complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell.* **106**: 417-428.
- Jeruzalmi, D., M. O'Donnell, and J. Kuriyan.** 2001b. Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell.* **106**: 429-441.
- Jonnson, Z. O., R. Hindges, and U. Hubscher.** 1998. Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *EMBO J.* **17**: 2412-2425.
- Kähler, M., and Antranikian, G.** 2000. Cloning and characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum islandicum*. *J. Bacteriol.* **182**: 655–663.

- Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K. D.** 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.*
- Kawarabayasi, Y., Y. Hino, H. Horikawa, K. Jin-no, M. Takahashi, M. Sekine, S. Baba, A. Ankai, H. Kosugi, A. Hosoyama, S. Fukui, Y. Nagai, K. Nishijima, R. Otsuka, H. Nakazawa, M. Takamiya, Y. Kato, T. Yoshizawa, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki, S. Masuda, M. Yanagii, M. Nishimura, A. Yamagishi, T. Oshima, and H. Kikuchi.** 2001. Complete genome sequence of an aerobic thermoacidphilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *DNA Res.* **8**: 123-140.
- Kawarabayasi, Y., Y. Hino, H. Horikawa, S. Yamazaki, Y. Haikawa, K. Jin-no, M. Takahashi, M. Sekine, S. Baba, A. Ankai, H. Kosugi, A. Hosoyama, S. Fukui, Y. Nagai, K. Nishijima, H. Nakazawa, M. Takamiya, S. Masuda, T. Funahashi, T. Tanaka, Y. Kudoh, J. Yamazaki, N. Kushida, A. Oguchi, K. Aoki, K. Kubota, Y. Nakamura, N. Nomura, Y. Sako, and H. Kikuchi.** 1999. Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res.* **6**: 83-101.
- Kelch, B.A., Makino, D.L., O'Donnell, M., and Kuriyan, J.** 2012. Clamp loader ATPases and the evolution of DNA replication machinery. *BMC Biol.* **10**: 34.
- Kelman, Z., and M. O'Donnell.** 1995. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 171-200.
- Komori, K., and Y. Ishino.** 2000. Functional interdependence of DNA polymerizing and 3' – 5' exonucleolytic activities in *Pyrococcus furiosus* DNA polymerase I. *Protein Eng.* **13**: 41-47.
- Kong, X. P., R. Onrust, M. O'Donnell, and J. Kuriyan.** 1992. Three-dimensional structure of the β subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* **69**: 425-437.
- Krishna, T. S. R., X. P. Kong, S. Gary, P. M. J. Burgers, and J. Kuriyan.** 1994. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**: 1233-1243.
- Kulaeva, O.I., E. V. Koonin, J. P. McDonald, S. K. Randall, N. Rabinovic, J. F. Connaughton, A. S. Levine, and R. Woodgate.** 2001. Identification of a DinB/UmuC homolog in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mutat. Res.* **357**: 245-253.
- Lee, S. H., A. D. Kwong, Z. Q. Pan, and J. Hurwitz.** 1991. Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase δ . *J. Biol. Chem.* **266**: 594-602.
- Li, X. and P. M. Burgers.** 1994a. Cloning and characterization of the essential *Saccharomyces cerevisiae*

- RFC4 gene encoding the 37kDa subunit of replication factor C. J. Biol. Chem. **269**: 21880-21884.
- Li, X. and P. M. Burgers.** 1994b. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* RFC3 gene, an essential component of replication factor C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**: 868-872.
- Lipps, G., Röther, S., Hart, C., and Krauss, G.** 2003. A novel type of replicative enzyme harbouring ATPase, primase and DNA polymerase activity. EMBO J. **22**: 2516–2525.
- Matsumiya, S., Y. Ishino, and K. Morikawa.** 2001. Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from *Pyrococcus furiosus*. Protein Sci. **10**: 17-23.
- Matsumiya, S., S. Ishino, Y. Ishino, and K. Morikawa.** 2002. Physical interaction between proliferating cell nuclear antigen and replication factor C from *Pyrococcus furiosus*. Genes Cells **7**: 911-922.
- Moldovan, G.L., Pfander, B. and Jentsch, S.** 2007 PCNA, the maestro of the replication fork. Cell, **129**: 665–679.
- Natale, D. A., Shankavaram, U. T., Galperin, M. Y., Wolf, Y. I., Aravind, L., and Koonin, E. V.** 2000. Towards understanding the first genome sequence of a crenarchaeon by genome annotation using clusters of orthologous groups of proteins (COGs). Genome Biol. **1**: research0009.1–0009.19.
- Noskov, V., S. Maki, Y. Kawasaki, S. H. Leem, B. I. Ono, H. araki, and A. Sugino.** 1994. The RFC2 gene encoding a subunit of replication factor C of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. **22**: 1527-1535.
- O'Donnell, M., D. Jeruzalmi, and J. Kuriyan.** 2001. Clump loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. Current Biology. **11**: 935-946.
- Ohmori, H., C. Friedberg, R. P. P. Fuchs, M. F. Goodman, F. Hanaoka, D. Hinkel, T. A. Kunkel, C. W. Lawrence, Z. Livneh, T. Nohmi, L. Prakash, S. Prakash, T. Todo, G. C. Walker, Z. Wang, and R. Woodgate.** 2001. The Y-family of DNA polymerase. Mol. Cell **8**: 7-8.
- Olsen G. J., and C. R. Woese.** 1997. Archaeal genomics: an overview. Cell **89**: 991-994.
- Perkins, G., and J. F. Diffley.** 1998. Nucleotide-dependent prereplicative complex assembly by Cdc6p, a homolog of eukaryotic and prokaryotic clamp-loaders. Mol. Cell **2**: 23-32.
- Perler, F. B., Comb, D. G., Jack, W. E., Moran, L. S., Qiang, B., Kucera, R. B., et al.** 1992. Intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 5577–5581.

- Perler, F. B., S. Kumar, and H. Kong.** 1996. Thermostable DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* **48**: 377-435.
- Pisani, F. M., M. De Felice, F. Carpentieri, and M. Rossi.** 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.
- Pisani, F. M., De Martino, C., and Rossi, M.** 1992. A DNA polymerase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* shows sequence similarity to family B DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **20**: 2711–2716.
- Podust, V. N., N. Tiwari, R. Ott, and E. Fanning.** 1998. Functional interactions among the subunits of replication factor C potentiate and modulate its ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **273**: 12935-12942.
- Rauen, M., M. A. Burtelow, V. M. Dufault, and L. M. Karnitz.** 2000. The human checkpoint protein hRad17 interacts with the PCNA-like proteins hRad1, hHus1, and hRad9. *J. Biol. Chem.* **275**: 29767-29771.
- Rogozin, I. B., Makarova, K. S., Pavlov, Y. I., and Koonin, E. V.** 2008. A highly conserved family of inactivated archaeal B family DNA polymerases. *Biol. Direct* **3**: 32.
- Sako, Y., N. Nomura, A. Uchida, Y. Ihida, H. Horii, Y. Koga, T. Hoaki, and T. Maruyama.** 1996. *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. Nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100°C. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 1070-1077.
- Sako, Y., P. C. Crocker, and Y. Ishida.** 1997. An Extremely heat-stable extracellular proteinase (aeropyrolysin) from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. *FEBS Letter.* **415**: 329-334.
- Seo, K. J., Cho, S. S., Ppyun, H.W., Youn, M. H., Kim, S. H., Seo, B. S., et al.** 2014. Characterization of a family B DNA polymerase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Ignicoccus hospitalis* KIN4/I and its application to PCR. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **173**: 1108–1120.
- Schinzel, R., and K. J. Burger.** 1984. Sensitivity of halobacteria to aphidicolin, an inhibitor of eukaryotic a-type DNA polymerases. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 187-190.
- She, Q., R. K. Singh, F. Confalonieri, Y. zivanovic, G. Allard, M. J. Awayez, C. C. Chan-Weiher, I. G. Clausen, B. A. Curtis, A. De Moors, G. Erauso, C. Fletcher, P. M. Gordon, de J. I. Heicamp, A. C. Jeffries, C. J. Kozera, N. Medina, X. Peng, H. P. Thi-Ngoc, P. Redder, M. E. Schenk, C. Theriault, N. Tolstrup, R. L. Charlebois, W. F. Doolittle, M. Duguet, T. Gaasterland, R. A. Garrett, M. A. Ragan, C. W. Sensen, and J. Van der Oost.** 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus*

- solfatarius* P2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **98**: 7835-7840.
- Terpe, K.** 2013. Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. **97**: 10243–10254.
- Torarinsson, E., Klenk, H. P., and Garrett, R. A.** 2005. Divergent transcriptional and translational signals in Archaea. Environ. Microbiol. **7**: 47–54.
- Tsurimoto, T.** 1998. PCNA, a multifunctional ring on DNA. Biochim. Biophys. Acta **1443**: 23-29.
- Tsurimoto, T., and B. Stillman.** 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.
- Uemori, T., Y. Ishino, H. Doi, and I. Kato.** 1995. The hyperthermophilic archaeon *Pyrodictium occultum* has two alpha-like DNA polymerases. J. Bacteriol. **177**: 2164-2177.
- Uemori, T., Y. Ishino, H. Toh, K. Asada, and I. Kato.** 1993. Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. Nucleic Acids Res. **21**: 259-265.
- Uemori, T., Y. Sato, I. Kato, H. Doi, and Y. Ishino.** 1997. A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. Genes Cells **2**: 499-512.
- Uhlmann, F., J. Cai, E. Gibbs, M. O'Donnell, and J. Hurwitz.** 1997. Deletion regions 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.
- Venclovas, C., and M. P. Thelen.** 2000. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. Nucleic Acids Res. **13**: 2481-2493.
- Vivona, J.B. and Kelman, Z.** (2003) The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins. FEBS Lett., **546**: 167–172.
- Waga, S., and B. Stillman.** 1998. The DNA replication fork in eukaryotic cells. Annu. Rev. Biochem. **67**: 721-751.
- Warbrick, E.** 1998. PCNA binding through a conserved motif. Bioessays **20**: 195-199.

- Warbrick, E.** 2000. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* **22**: 997-1006.
- Warbrick, E., D. P. Lane, D. M. Glover, and L. S. Cox.** 1997. Homologous regions of Fen1 and p21Cip1 compete for binding to the same site on PCNA: a potential mechanism to coordinate DNA replication and repair. *Oncogene* **14**: 2313-2321.
- Woese, C. R., and G. E. Fox.** 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5088-5090.
- Yamazaki, S., Yamazaki, J., Nishijima, K., Otsuka, R., Mise, M., Ishikawa, H., et al.** 2006. Proteome analysis of an aerobic hyperthermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *Mol. Cell. Proteomics* **5**: 811-823.
- Yan, J., Beattie, T. R., Rojas, A. L., Schermerhorn, K., Gristwood, T., Trinidad, J. C., et al.** 2017. Identification and characterization of a heterotrimeric archaeal DNA polymerase holoenzyme. *Nat. Commun.* **8**: 15075.
- Yanisch-Perron, C., J. Vierra, and J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
- Young, M. C., M. K. Reddy, and P. H. von Hippel.** 1992. Structure and function of the bacteriophage T4 DNA polymerase holoenzyme. *Biochemistry* **31**: 8675-8690.
- Zhang, P., S. J. Zhang, Z. Zhang, J. F. Woessner, Jr., and M. Y. W. T. Lee.** 1995. Expression and physicochemical characterization of human proliferating cell nuclear antigen. *Biochemistry* **34**: 10703-10712.
- Zhang, S. J., X. R. Zeng, P. Zhang, N. L. Toomey, R. Y. Chuang, L. S. Chang, and M. Y. W. T. Lee.** 1995. A conserved region in the amino terminus of DNA polymerase delta is involved in proliferating cell nuclear antigen binding. *J. Biol. Chem.* **270**: 7988-7992.
- Zhou, B., J. D. Pata, and T. A. Steitz.** 2001. Crystal structure of a DinB lesion bypass DNA polymerase catalytic fragment reveals a classic polymerase catalytic domain. *Mol. Cell* **8**: 427-437.

図表

Table 1-1 アーキア及び真核生物のPCNAのアミノ酸配列の比較

Organism	A.A	MW × 10 ³	pI	% Amino Acid Identity								
				Ape-1	Ape-2	Ape-3	Pfu	Mja	Afu	Mth	Hsa	Sce
<i>A. pernix</i> -1	263	29.4	4.57									
<i>A. pernix</i> -2	249	28.3	4.46	27								
<i>A. pernix</i> -3	251	28.6	4.49	25	20							
<i>P. furiosus</i>	249	28.0	4.34	31	28	26						
<i>M. jannaschii</i>	247	27.3	4.45	27	22	23	38					
<i>A. fulgidus</i>	245	27.3	4.69	20	18	16	23	26				
<i>M. thermoautotrophicum</i>	244	28.0	4.24	20	22	19	29	30	24			
<i>H. sapiens</i>	262	28.9	4.46	15	20	16	22	21	20	26		
<i>S. cerevisiae</i>	258	28.9	4.26	14	16	14	23	26	19	22	34	
<i>D. melanogaster</i>	260	28.8	4.54	17	19	16	23	21	19	22	71	35

表中の生物種の略称を以下に示す。

Ape : *A. pernix*、Pfu : *P. furiosus*、Mja / *M. jannaschii* : *Methanococcus jannaschii*、Afu / *A. fulgidus* : *Archaeoglobus fulgidus*、Mth / *M. thermoautotrophicum* : *Methanobacterium thermoautotrophicum*、Hsa / *H. sapiens* : *Homo sapiens*、Sce / *S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*、*D. melanogaster* : *Drosophila melanogaster*

Table 1-2 3種のクレンアーキオタのPCNAのアミノ酸配列の比較

Organism	A.A	MW ×10 ³	pI	% Amino Acid Identity							
				Ape-1	Ape-2	Ape-3	Sso-1	Sso-2	Sso-3	Sto-1	Sto-2
<i>A. pernix</i> -1	263	29.4	4.57								
<i>A. pernix</i> -2	249	28.3	4.46	27							
<i>A. pernix</i> -3	251	28.6	4.49	25	20						
<i>S. solfataricus</i> -1 (0397)	249	27.5	5.18	15	19	23					
<i>S. solfataricus</i> -2 (0405)	259	29.3	4.63	22	22	24	19				
<i>S. solfataricus</i> -3 (1047)	246	27.6	4.38	23	22	19	18	20			
<i>S. tokodaii</i> -1 (0387)	245	27.3	4.49	23	23	27	18	61	23		
<i>S. tokodaii</i> -2 (0397)	248	27.5	5.06	20	21	25	52	21	22	20	
<i>S. tokodaii</i> -3 (0944)	246	27.4	4.13	19	24	22	18	24	48	24	21

表中の生物種の略称を以下に示す。

Ape / *A. pernix* : *Aeropyrum pernix*、Sso / *S. solfataricus* : *Sulfolobus solfataricus*、Sto / *S. tokodaii* : *Sulfolobus tokodaii*

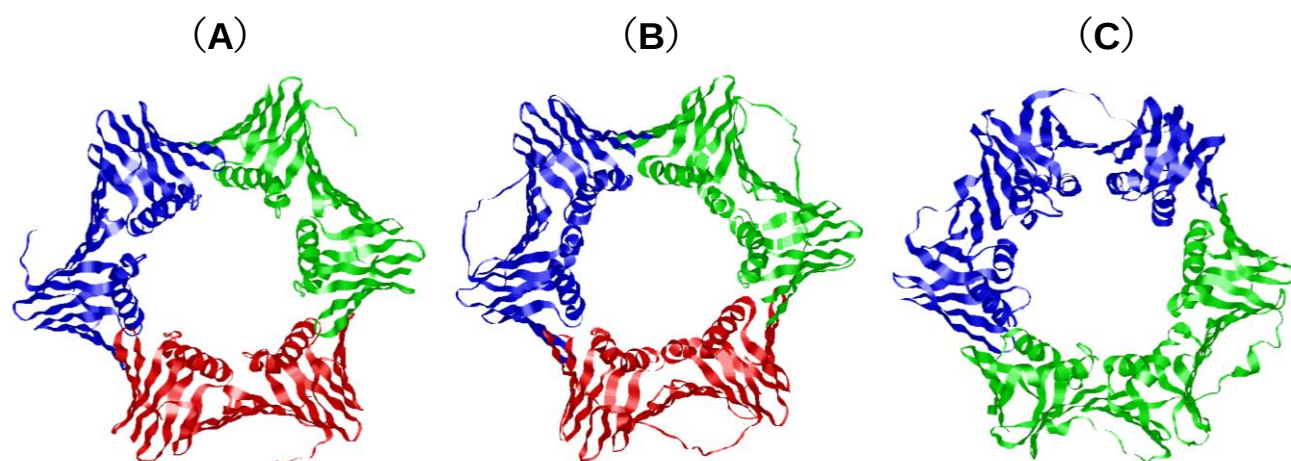


Figure 1-1 3つの生物ドメインにおけるクランプ分子の結晶構造

(A) *Pyrococcus furiosus*のPCNA三量体 (PDB code、1GE8)、(B) *Homo sapiens*のPCNA三量体 (PDB code、1AXC)、(C) *Escherichia coli*の β サブユニット二量体 (PDB code、2POL)。各色で区別した部分がそれぞれの単量体に相当する。

(A)

```
GTGTCCTCTGAGGCCACCCTAGACTCAGAG TTTACCGATTATAAGGCTATGTTTAGATAC 60
M S S E A T L D S E F T D Y K A M F R Y (20)
GAGGCTAAGGTGTTTAAGGAAGTAGTAGAC AGCGTGTCTAAAATCCTGGACGAGGGCCTG 120
E A K V F K E L V D S V S K I L D E G L (40)
TTTATAATAACAGGAGAGGGTCTGAGGCTT AGAGGCATGGATCCGGCGAGGGTTGCATTA 180
F I I T G E G L R L R G M D P A R V A L (60)
GTCGACATAGAAATACCGTCTTCATCATTG TTCGACTTCTACATGGCTGGGGATGTCGAG 240
V D I E I P S S S F F D F Y M A G D V E (80)
CGTGTGGAGCTAGGCGTTAACATGGAGACT CTTAAGGGTGTAGTGGCGAGGGCAAAGAAG 300
R V E L G V N M E T L K G V V A R A K K (100)
GGTGACCAGCTGGAGGTAAGGGTTAGGGAG GATAAAGTCCTGTTTCATCGTCGAGAGCGTT 360
G D Q L E V R V R E D K V L F I V E S V (120)
GTCCTGAGGAGGTATCTTCTCCCAATCTT GAAGTTATAGTGGATGTTCTGAGGATATC 420
V L R R Y L L P N L E V I V D V P E D I (140)
TCCCTCGAGTTCGACGCCACCGCCACTGTT ATAGCTGACGTTGTTAAGAAAACACTGCGT 480
S L E F D A T A T V I A D V V K K T L R (160)
GATGTCGAGCTTGTGGGAGATATTGTGGAG TTCGACGCTGGCGAGGATTATCTTTCCATA 540
D V E L V G D I V E F D A G E D Y L S I (180)
AGGAGTGTAGGTCCTGAGAGGAGAAGGGTA GAGACCAGGCTAACTAGGGAGAGCCCCGCC 600
R S V G P E R R R V E T R L T R E S P A (200)
CTGATAGACCTTGAGGTTAAGGAGCCGGCC ACAAGCAGGTACGACGTGGGCTACTTGAAG 660
L I D L E V K E P A T S R Y D V G Y L K (220)
AGGATGCTTGGTGTGGCTAAGATAGCTGAG AGCATAGAGCTGTCGTTCTCCACCGACAAG 720
R M L G V A K I A E S I E L S F S T D K (240)
CCTTTGAAGATGGTGTTCAGTGCCTGGAC GGCAGTAGGGTTACCTACCTTTTAGCTCCC 780
P L K M V F K S P D G S R V T Y L L A P (260)
TCGACAGGTTAG 792
S T G * (263)
```

Figure 1-2 *A. pernix*のPCNAホモログの、ヌクレオチド配列及び予想されるアミノ酸配列

(A) ApePCNA1 (APE0162) 全792塩基対、263アミノ酸長、アスタリスクは終止コドンを示す。

(B)

TTGGCCGACGCTAGGTTCTACTTTAGCGAT GCCAGGACGTGGAGATATATGGTCGCCTCT 60
M A D A R F Y F S D A R T W R Y M V A S (20)
ATCGAGAAGATTATAGAGGAGGGCGTGTC GTCGCTACCGGGGAGGGGCTGTCTCTGAGG 120
I E K I I E E G V F V A T G E G L S L R (40)
GCCCTCGACACTAGCCACGTAGCCATGGTC GACCTCTACTACCGAACACCGCGTTTCATC 180
A L D T S H V A M V D L Y Y P N T A F I (60)
GAGTACGATATCGGCGGCGAGTCTGTGGAG TTTGGTGTGTCCTTCGACCTACTCTCCAAG 240
E Y D I G G E S V E F G V S F D L L S K (80)
GTGCTGAGGAGGGCTAGGAAGGAGGACGAG CTGGTGCTGGAGGTGGAGGGGAGCAGGCTG 300
V L R R A R K E D E L V L E V E G S R L (100)
GCTGTGAAGCTTAAGAGCAGGGGGGAGAGG ACGTTCAGGATACCGCAGGTGCTCATGACC 360
A V K L K S R G E R T F R I P Q V V M T (120)
TACGAGAAGCTGCCCCGAGCCTAAGGTGTCG TTCACCGTCAGGGCTAGGATGCTCGGCTCC 420
Y E K L P E P K V S F T V R A R M L G S (140)
ACCTTCAGGGAGGCGGTGAGGGATTTGGAG CCTCACAGCGAGACCCTCACCTCAGGGCA 480
T F R E A V R D L E P H S E T L T L R A (160)
CTCGAGGACGCCCTGCTTCTGGTCGGCAGC AGCGAGATGGCCACGGTTGAGATAGAGCTC 540
L E D A L L L V G S S E M A T V E I E L (180)
TCACAATCCCGAGGCTCGCTCCTAGACTAT GAGGCGGAGTCGCAGGATAGGGCTAGCTAC 600
S Q S R G S L L D Y E A E S Q D R A S Y (200)
AGTATAGAATATTTGAGCGAGATGCTTAGC GCCGCGCAGGCGGCGGACGCTGTTGTAGTG 660
S I E Y F S E M L S A A Q A A D A V V V (220)
AGCTTCTCTGAGGACGCTCCTGTGAGGGTT GACATGGAGTACCTGGGCGGTGGTAGGCTG 720
S F S E D A P V R V D M E Y L G G G R L (240)
ACGTTCTATGTATCGCCGAAGATCGAGTAG 750
T F Y V S P K I E * (249)

Figure 1-2 A. *pernix*のPCNAホモログの、ヌクレオチド配列及び予想されるアミノ酸配列

(B) ApePCNA2 (Ape0441) 全750塩基対、249アミノ酸長。ApePCNA2Sには無く、ApePCNA2Lで追加されたN末端部分の配列をアンダーラインで表す。またアスタリスクは終止コドンを示す。

(C)

```
GTGTTCACTAGTATACACTGCCTCGTCT AAGTTCAAGTATATAGCCCAGACCCTGGCT 60
M F R L V Y T A S S K F K Y I A Q T L A (20)
AAGATAACGACGAGGGCGTCTTCGAGTTC TCTCTAGACGGTTTGAGGGCGTGGATAATG 120
K I N D E G V F E F S L D G L R A W I M (40)
AGCCCAGACAAGACTAGCCTGGCTATATTG GAGATGCCTTCCTAAGCTTCGAGGAGTAT 180
S P D K T S L A I L E M P S L S F E E Y (60)
ATGGTTGAGGAGGAGATGAGGGTAGTCCTC AGGACAGACGAGCTGAACAAGATCTCTAAA 240
M V E E E M R V V L R T D E L N K I S K (80)
AGGGCTACGAGGAACGACGACATAATCTTT CAGTGAATGCGGAGGAGCAGGCCCTCGAG 300
R A T R N D D I I F Q W N A E E Q A L E (100)
GTGGAGCTGAGGGATAGAAAAGTGGTTC TCGAGAAAATTCCTTGTTCCCGCAACTTCT 360
V E L R D R K L G F S R K F L V P A T S (120)
GTTGGAGCCGAGGAGATGAGGAGGCTCAAG CTAGAGCCCACGGTATCCTTCACCATACTG 420
V G A E E M R R L K L E P T V S F T I L (140)
ACCGACGACTTGAAAGCCATGATCCAGGAT GTAAAGGTTGTAGGAGACTTCGCGGAGTTC 480
T D D L K A M I Q D V K V V G D F A E F (160)
GAGGCCAGCGAGGGCCAGGTAGTCGTTAGG AGCCAGGCGGAGGAGAAGGAGTATGAGTGG 540
E A S E G Q V V V R S Q A E E K E Y E W (180)
GTCATGAAGCCTGGTGACGTGCTTTTGAGC CTAGAGGTTGAGGAGGACGCTAAGTCTATA 600
V M K P G D V L L S L E V E E D A K S I (200)
TATTCTAGGCAGGTGCTTGAGATCGCCACG AAGCCCGTGGGAGCTGCGGAGAGCGTGAAA 660
Y S R Q V L E I A T K P V G A A E S V K (220)
GTCTCTTTTCGCAAGCGACTACCCCATGAAG ATCGAGTATACTTTCCCGAACGGCGAGAGG 720
V S F A S D Y P M K I E Y T F P N G E R (240)
ATGGAGCTGTACATGGCGCCCAGCCTAGCT GGCTAG 756
M E L Y M A P S L A G * (251)
```

Figure 1-2 *A. pernix*のPCNAホモログの、ヌクレオチド配列及び予想されるアミノ酸配列

(C) ApePCNA3 (Ape2182) 全756塩基対、251アミノ酸長、アスタリスクは終止コドンを示す。

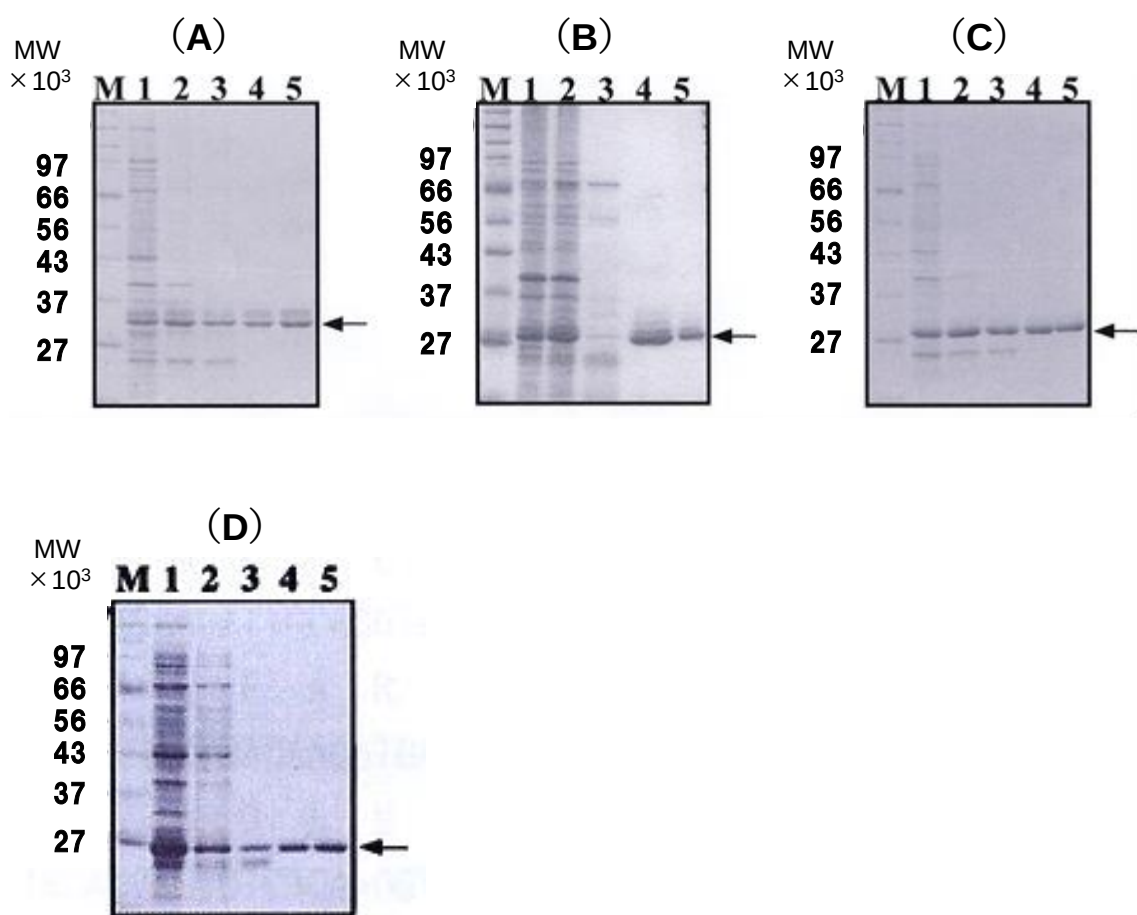


Figure 1-3 大腸菌中で発現させたApePCNAホモログの精製パターン

各工程のサンプルはすべて、10%濃度のゲルを用いたSDS-PAGEで分画し、クーマシーブリリアントブルー溶液で染色した。分子量マーカー（Protein Marker, Broad Range、NEB社製）のサイズを、各パネルの左側に示した。また目的のPCNAのバンドを、各パネルの右側より矢印で表した。

(A) 組換えApePCNA1の精製工程、Lane M；分子量マーカー、Lane 1；超音波破碎した細胞抽出液、Lane 2；75°Cで15分加熱した遠心上清、Lane 3；ポリエチレンイミン処理後の遠心上清、Lane 4；HiTrap-Qによる溶出画分、Lane 5；HiTrap-Heparinによる溶出画分。(B) 組換えApePCNA2Lの精製工程：各レーンにおいて使用したサンプルについては(A)と同じ。(C) 組換えApePCNA3の精製工程：各レーンにおいて使用したサンプルについては(A)と同じ。(D) 組換えApePCNA2Sの精製工程：Lane M；分子量マーカー、Lane 1；超音波破碎した細胞抽出液、Lane 2；ポリエチレンイミン処理後の遠心上清、Lane 3；HiTrap Phenyl Sepharose HPによる溶出画分、Lane 4；HiTrap-Qによる溶出画分、Lane 5；HiTrap-Heparinによる溶出画分。

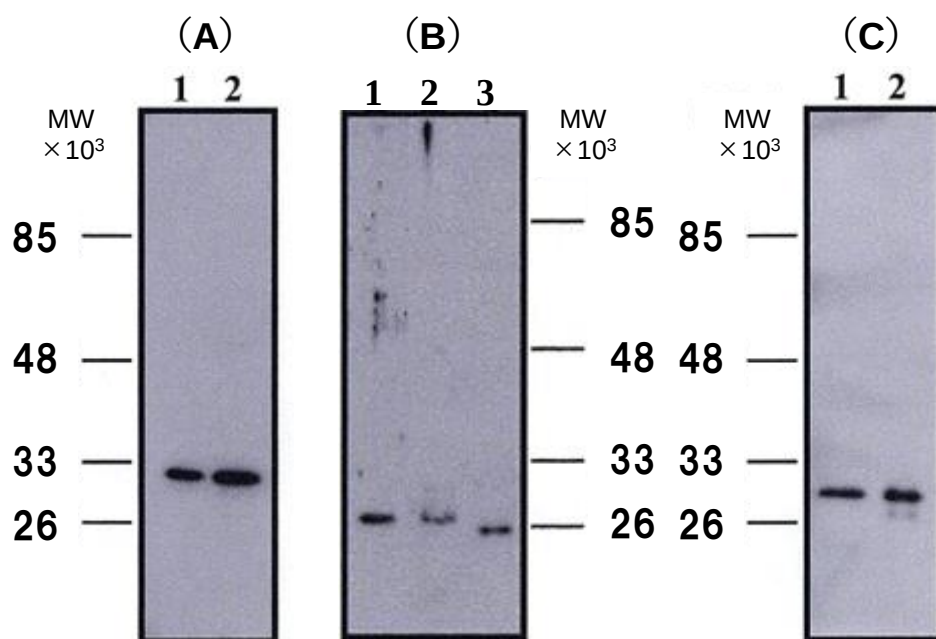


Figure 1-4 *A. pernix*細胞溶液中のPCNAの検出

組換えApePCNA及び*A. pernix*の細胞抽出液を、10%濃度のSDS-PAGEにかけ、各PCNAに対する抗体溶液を用いたウエスタンブロッティングにより分析した。(A)組換えApePCNA1 (Lane 1; 40ng) 及び細胞抽出液 (Lane 2; 30μg相当) をSDS-PAGEにかけ、抗ApePCNA1抗体溶液で検出した。(B)組換えApePCNA2L (Lane 1; 40ng)、細胞抽出液 (Lane 2; 30μg相当) 及び組換えApePCNA2S (Lane 3; 80ng) をSDS-PAGEにかけ、抗ApePCNA2抗体溶液で検出した。(C)組換えApePCNA3 (Lane 1; 10ng) 及び細胞抽出液 (Lane 2; 15μg相当) をSDS-PAGEにかけ、抗ApePCNA3抗体溶液で検出した。

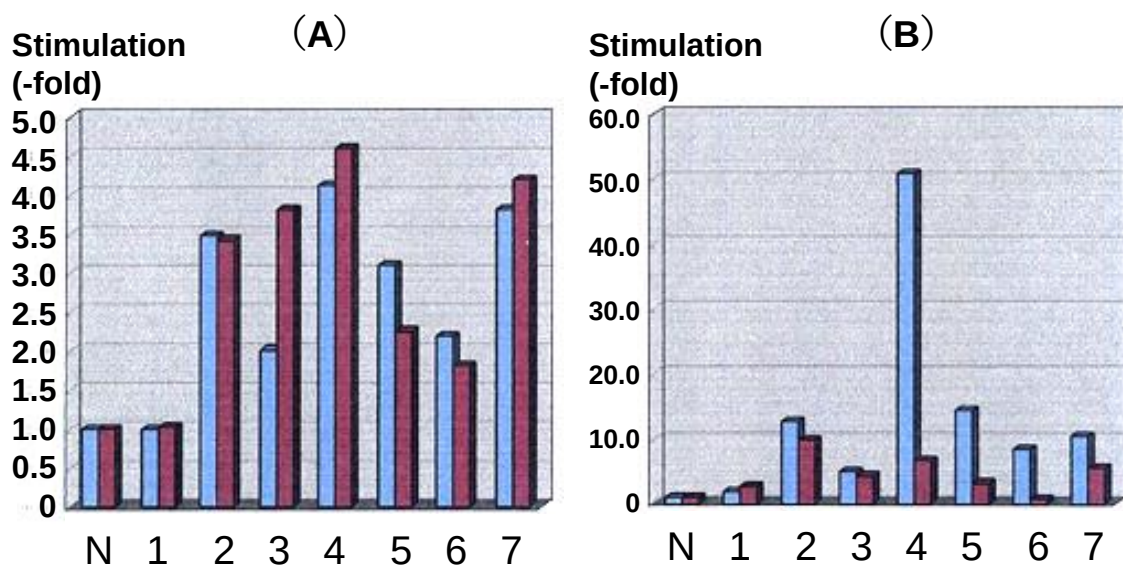


Figure 1-5 ヌクレオチド取込み反応

(A) はApePolIを、(B) はApePolIIIをDNAポリメラーゼとして使用した。環状DNA（青色で示す）又は直鎖状DNA（赤色で示す）を鋳型として用い、各ApePCNA並びにそれらの混合物を加えて反応させた。縦軸は、ApePCNAを加えなかった時の値を1.0とした際の相対値。横軸：N；No PCNA、1；ApePCNA、2；ApePCNA1+2L、3；ApePCNA2L、4；ApePCNA2L+3、5；ApePCNA3、6；ApePCNA2S、7；*P. furiosus*の各PCNAを使用した。

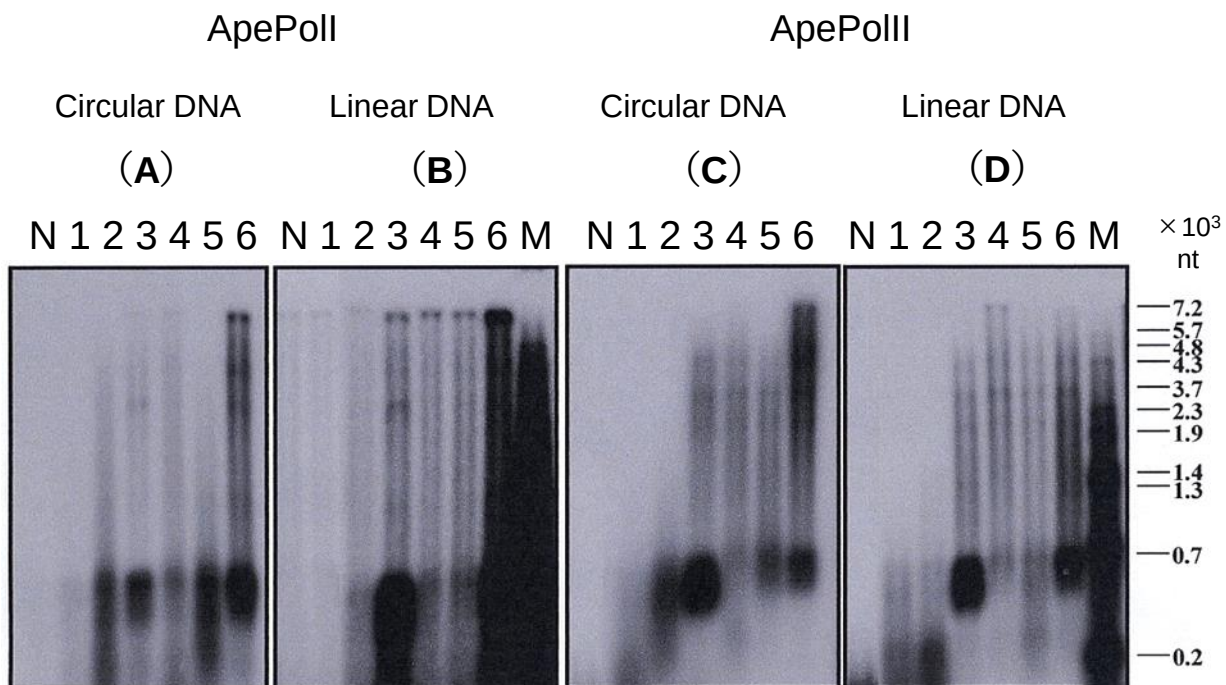


Figure 1-6 ApePolI及びAprPolIIのプライマー伸長反応

(A) 及び (B) はApePolIを、(C) 及び (D) はApePolIIを使用した。鋳型として、環状DNA (A及びC) 並びに直鎖状DNA (B及びD) を用い、各ApePCNA並びにそれらの混合物を加えて反応させた。Lane N; No PCNA、Lane 1; ApePCNA1、Lane 2; ApePCNA2S、Lane 3; ApePCNA2L、Lane 4; ApePCNA3、Lane 5; ApePCNA2S+ApePCNA3、Lane 6: ApePCNA2L+ApePCNA3、Lane M: 分子量マーカーとしてBstPIで切断した λ DNAのサイズ ($\times 10^3$ 塩基) を示した。

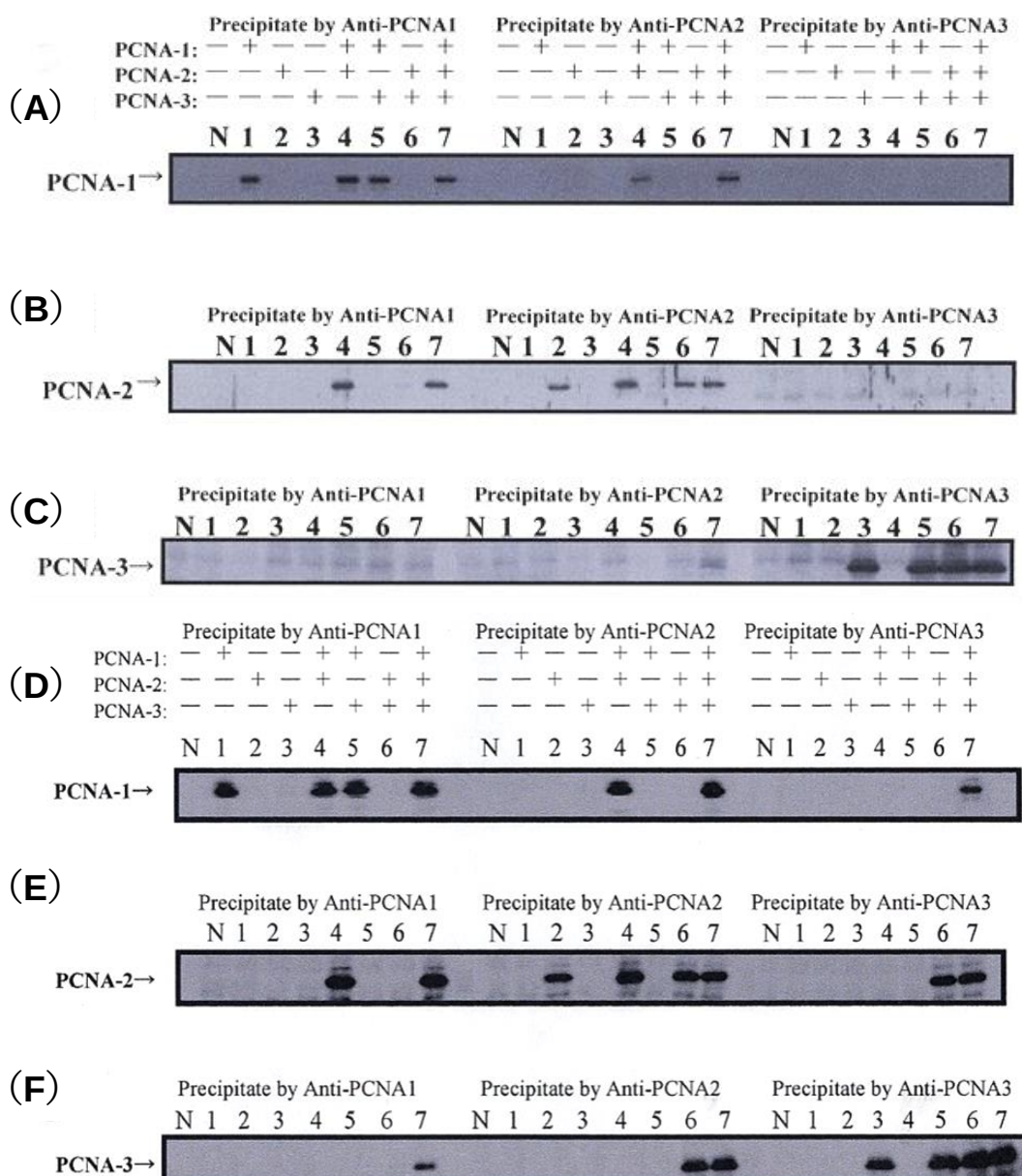


Figure 1-7 各ApePCNAを用いた免疫沈降実験

(A)、(B)及び(C)は、精製した各ApePCNAに対し、抗ApePCNA1抗体（各パネルの左側部分）、抗ApePCNA2抗体（中央部分）及び抗ApePCNA3抗体（右側部分）を反応させ、免疫沈降分析を行った。免疫的に反応させて生じた生成物をProtein A-セファロースで集め、12%濃度のSDS-PAGEの後、(A)抗ApePCNA1抗体、(B)抗ApePCNA2抗体、及び(C)抗ApePCNA3抗体をそれぞれ用いてウェスタンブロッティングを行った。Lane N; No PCNA、Lane 1; ApePCNA1、Lane 2; ApePCNA2S、Lane 3; ApePCNA3、Lane 4; ApePCNA1 + ApePCNA2S、Lane 5; ApePCNA1 + ApePCNA3、Lane 6; ApePCNA2S + ApePCNA3、Lane 7; ApePCNA1 + ApePCNA2S + ApePCNA3を示す。(D)、(E)及び(F)は、上記(A)、(B)及び(C)において、ApePCNA2Sの代わりにApePCNA2Lを使用し、それ以外の条件は同様に実施した。各Laneについても、ApePCNA2SがApePCNA2Lとなる以外は同じである。

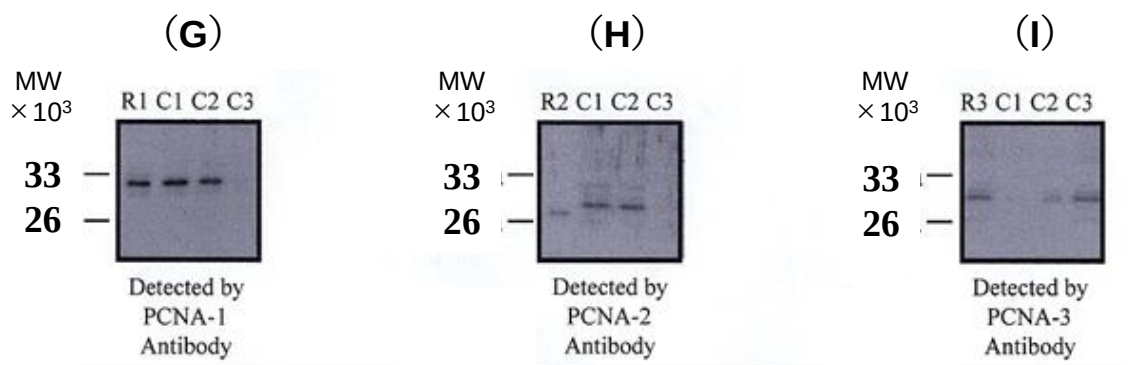


Figure 1-7 各ApePCNAを用いた免疫沈降実験（続き）

(G)、(H) 及び (I) は、*A. pernix*の細胞抽出液を用い、抗ApePCNA1抗体 (Lane C1)、抗ApePCNA2抗体 (Lane C2) 及び抗ApePCNA3抗体 (Lane C3) を反応させた。反応生成物をProtein A-セファロースで集め、上記と同様に電気泳動した後、(G) 抗ApePCNA1抗体、(H) 抗ApePCNA2抗体、及び (I) 抗ApePCNA3抗体をそれぞれ用いてウエスタンブロッティングにより分析した。陽性コントロールとして、精製した各ApePCNAをそれぞれの抗体で免疫沈降させたサンプルを各実験に用いた (Lane R1 ; ApePCNA1、Lane R2 ; ApePCNA2S、Lane R3 ; ApePCNA3)。

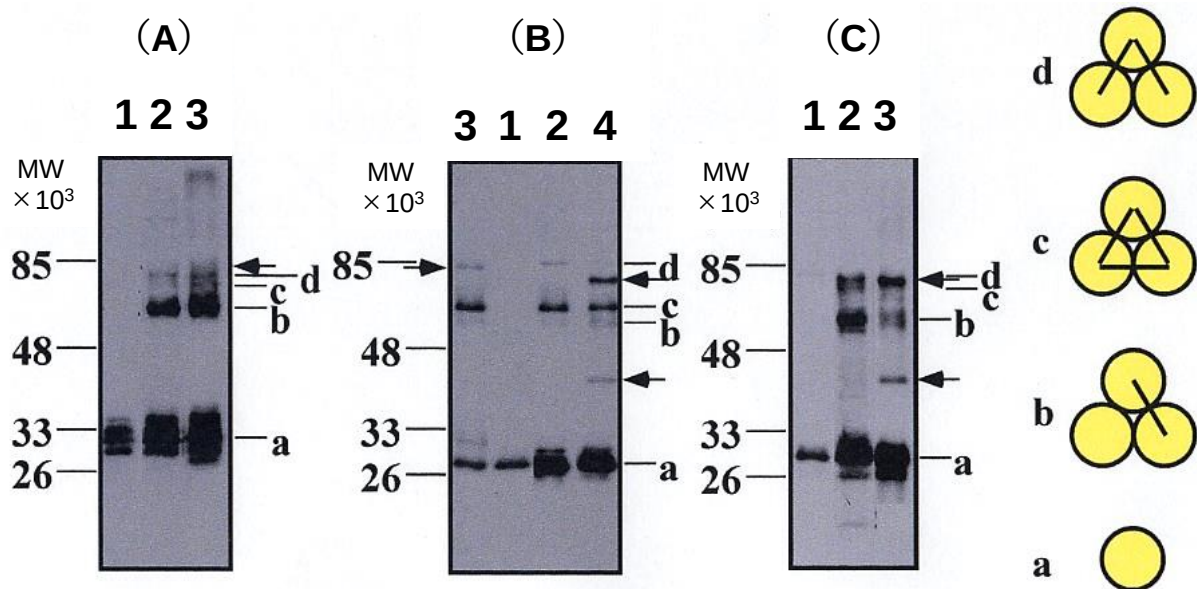


Figure 1-8 ケミカルクロスリンク反応による各種ApePCNAの多量体形成の解析

(A) Lane 1 ; ApePCNA1のみ、Lane 2 ; ApePCNA1 + Sulfo-EGS、Lane 3 ; ApePCNA1とApePCNA2の混合物 + Sulfo-EGSを示す。反応生成物を10%濃度のSDS-PAGEにかけ、抗ApePCNA1抗体を用いたウエスタンブロットにより分析した。

(B) Lane 1 ; ApePCNA2Lのみ、Lane 2 ; ApePCNA2L + Sulfo-EGS、Lane 3 ; ApePCNA1とApePCNA2Lの混合物 + Sulfo-EGS、Lane 4 ; ApePCNA2LとApePCNA3の混合物 + Sulfo-EGSを示す。反応生成物は、上記と同様の方法で、抗ApePCNA2抗体を用いたウエスタンブロットにより分析した。(C) Lane 1 ; ApePCNA3のみ、Lane 2 ; ApePCNA3 + Sulfo-EGS、Lane 3 ; ApePCNA2とApePCNA3の混合物 + Sulfo-EGS。反応生成物は、以下上記と同様の方法で、抗ApePCNA3抗体を用いたウエスタンブロットにより分析した。各パネル中に、PCNA単量体バンド (a)、1ヶ所架橋された2量体バンド (b)、3ヶ所架橋された環状3量体バンド (c)、そして2ヶ所架橋された直鎖状3量体バンド (d)を示した。T4ファージのgp45タンパク質において表された、それぞれの架橋の模式図を図の右側に示した。異種のPCNAにより新たに生じたと考えられるバンドを、各パネルの矢印により示した。また電気泳動の際に用いた分子量マーカー (APROサイエンス Inc.) に相当するサイズを、各パネルの左側に示した。

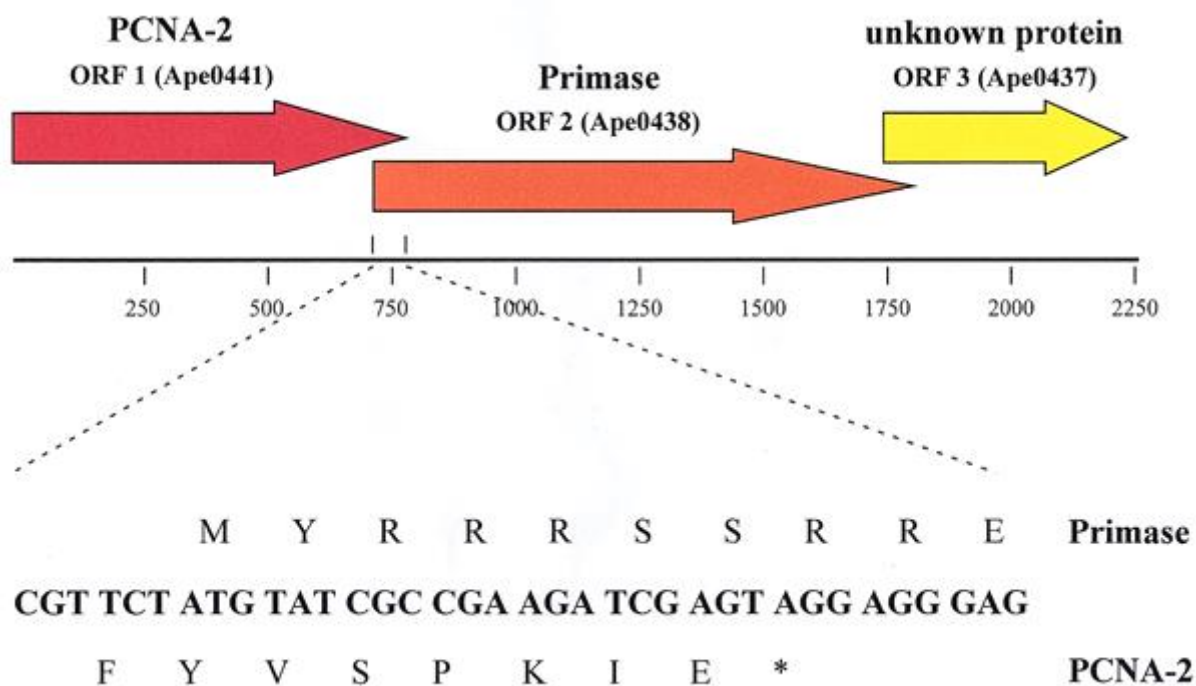


Figure 1-9 *A. pernix*のゲノム配列におけるApePCNA2とプライマーゼホモログの配置
ApePCNA2のC末端部分とプライマーゼホモログのN末端付近の遺伝子配列及び予想されるアミノ酸配列を示す。プライマーゼホモログのC末端部分には、さらに未知のタンパク質のN末端部分の配列がオーバーラップしている可能性がある。

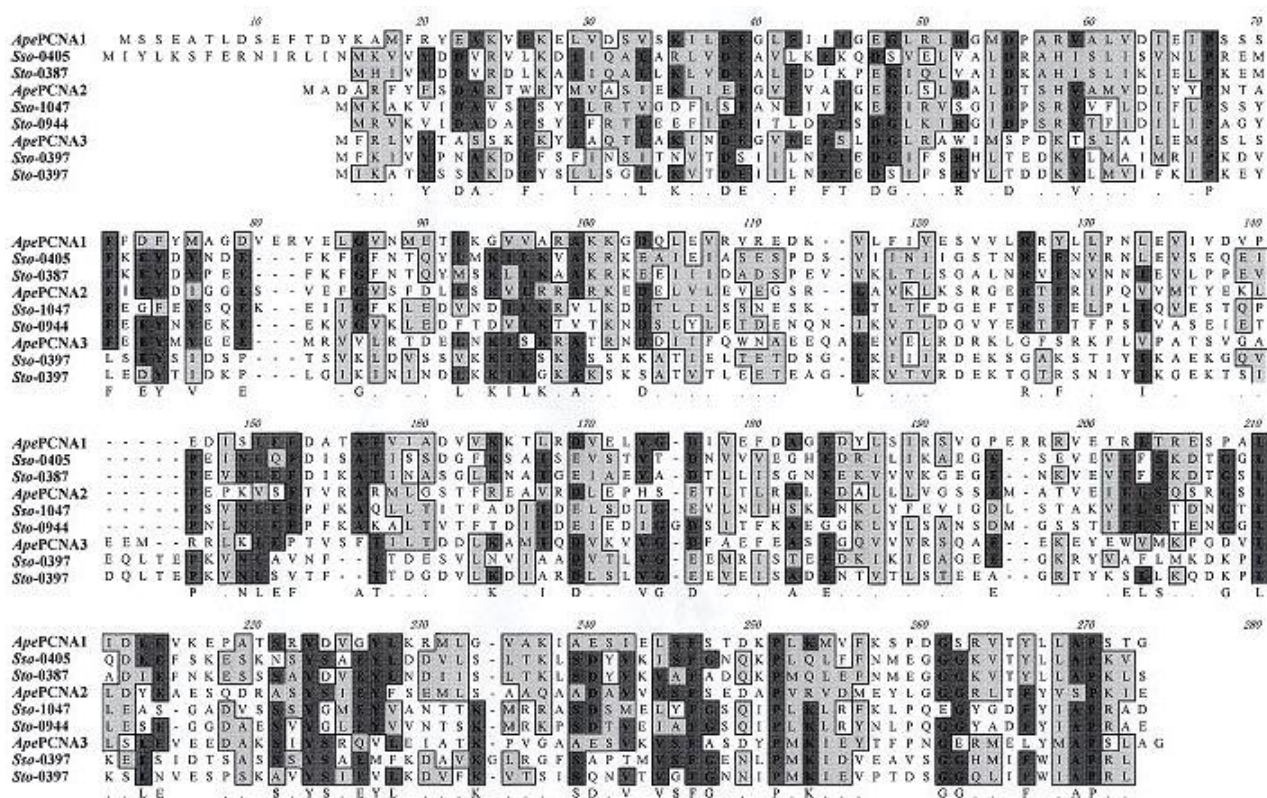


Figure 1-10 3種のApePCNA、*S. solfataricus*及び*S. tokodaii*のPCNAのアミノ酸配列のアライメント

同一のアミノ酸は黒地で、類似のアミノ酸は灰色地で表した。Ape ; *A. pernix*、Sso ; *S. solfataricus*、Sto ; *S. tokodaii*をそれぞれ示す。

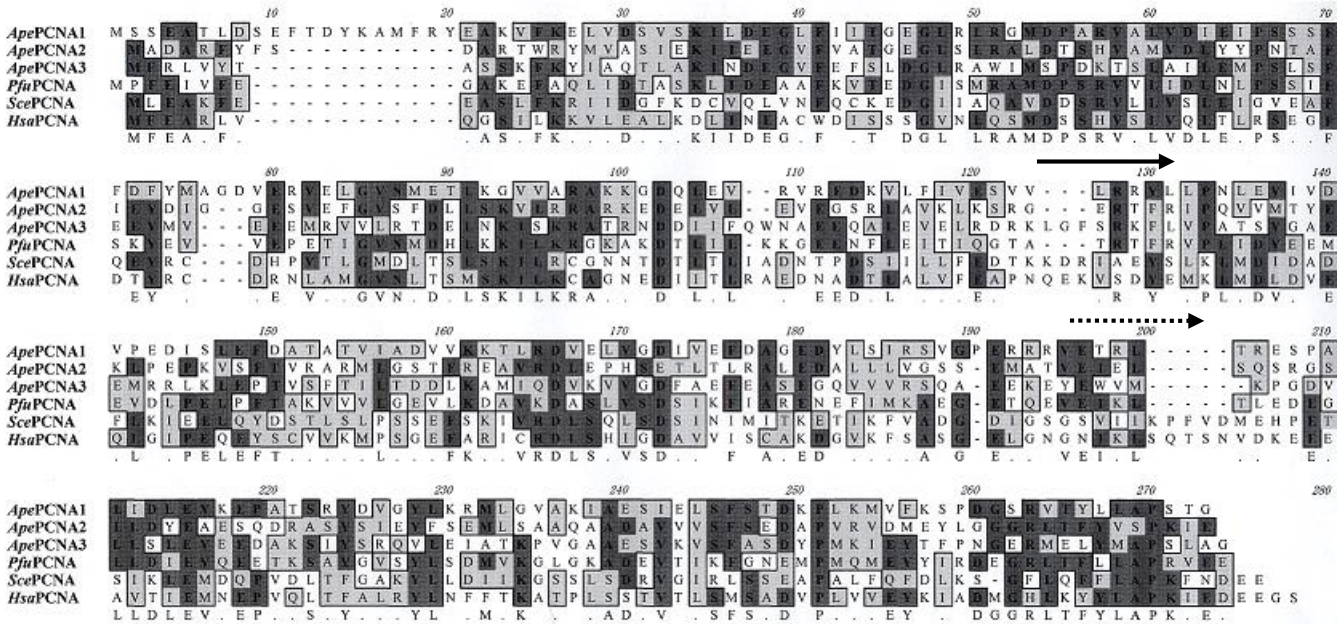


Figure 1-11 3種のApePCNA、*P. furiosus*、酵母及びヒトのPCNAのアミノ酸配列のアライメント Figure 1-10と同様、同一のアミノ酸は黒地で、類似のアミノ酸は灰色地で表した。Ape ; *A. pernix*、Pfu : *P. furiosus*、Sce : *S. cerevisiae*、Hsa : *H. sapiens*をそれぞれ示す。

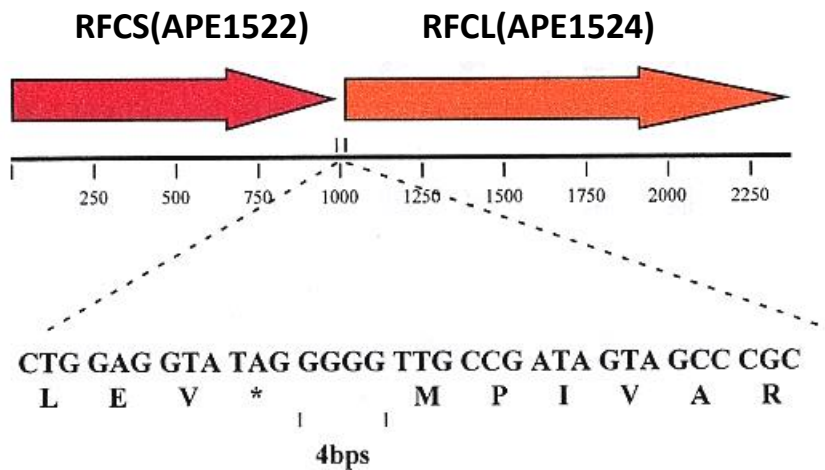


Figure 2-1 ApeRFCの遺伝子構造の模式図

RFCS及びRFCL遺伝子は*A. pernix*のゲノム中にタンデムに並んでいた。ORF部分を、着色した矢印で示した。RFCSの3'末端部分とRFCLの5'末端部分を下の部分に表した。RFCSの3'末端の終止コドン（TAG）のあと4塩基のGが続き、その後すぐにRFCLのORFの5'末端に相当する開始メチオニン（TTG）の配列が始まっている。

(A) TTGTCCAGCGTTCTGGAGATGCTCTGGGTG GAGAAGTACAGGCCAGGAGCCTGGATGAT 60
M S S V L E M L W V E K Y R P R S L D D (20)
ATCGTCGACCAGAAGCATGTGGTCGAGAGG TTGAAACAGTTTGTAAAGCAGAGGAACATG 120
I V D Q K H V V E R L K Q F V K Q R N M (40)
CCACACCTCCTATTTCGAGGGCCCCCGGGC ACGGGTAAGACGACTGCTGCCATGCACTA 180
P H L L F A G P P G T G K T T A A H A L (60)
GCCCACGATCTCTTCGGCGAGAATTACAGG CAGTATATGCTAGAGCTGAATGCTAGCGAC 240
A H D L F G E N Y R Q Y M L E L N A S D (80)
GAGAGGGGTATCAATGTTATCAGGGAGAAG GTTAAGGAGTTTGCCCGTAGCAGGACGCC 300
E R G I N V I R E K V K E F A R S R T P (100)
CCGGAGATTCCCTTCAAGATCGTGCTACTA GACGAGGCTGACAACATGACGAGCGACGCC 360
P E I P F K I V L L D E A D N M T S D A (120)
CAGCAGGCTCTCAGGAGGCTTATGGAGCTT TACAGCAGTGTACAAGGTTTATACTGATA 420
Q Q A L R R L M E L Y S S V T R F I L I (140)
GCAAATATCCAGCAAGATTATAGACCGG ATACAGAGCAGGTGCGCATTCTTCAGGTTT 480
A N Y P S K I I D P I Q S R C A F F R F (160)
CAGCCCCTATCCAAGCAGGACGTTATCGAG AGGCTGAGGTATATAGCCGAGAACGAGGGT 540
Q P L S K Q D V I E R L R Y I A E N E G (180)
GTAGATTACGAGGAGGAGGCTCTGGACGCC ATATACGAGATAAGCGAGGGCGACATGAGG 600
V D Y E E E A L D A I Y E I S E G D M R (200)
AAGGCCATTAACGTCCTCCAAGCGCCAGC TACCTCGGCAAGGTGACCGTCGACGCGGTG 660
K A I N V L Q A A S Y L G K V T V D A V (220)
TACAGGGTAGTGGGTATGGCGAAGCCAGA GAGGTTAGGGAGATGCTGCCACCGCCCTG 720
Y R V V G M A K P R E V R E M L A T A L (240)
AAAGGCGACTTCACCGCGCCAGAAGCCTC CTCCGGAAGATAATGATAGAGTATGGAATG 780
K G D F T A A R S L L R K I M I E Y G M (260)
AGCGGCGAGGATGTTGCCCGGCAGATACAC AGGGAGCTATTCTCCACAGAGCTTAAGATG 840
S G E D V A R Q I H R E L F S T E L K M (280)
CCCGAGGAGCTTAGGGTTCTCGCAGCAGAC TATCTGGGGGAGGTCCACTACAGGCTTGTG 900
P E E L R V L A A D Y L G E V H Y R L V (300)
GAGGGTAGCGACGACGATATACAGCTCTCC GCCTTCCTCGCGTGGCTGACAATGATGTCG 960
E G S D D D I Q L S A F L A W L T M M S (320)
AGAAAACTGGAGGTATAG 978
R K L E V * (325)

Figure 2-2 A. *pernix*のRFCホモログの、ヌクレオチド配列及び予想されるアミノ酸配列

各配列の右側には、開始メチオニンの位置からのヌクレオチドのナンバー及びアミノ酸数（カッコ内）を示した。（A）ApeRFCS（APE1522）全978塩基対、325アミノ酸長、アスタリスクは終止コドンを示す。（B）ApeRFCL（APE1524）全1440塩基対、479アミノ酸長、アスタリスクは終止コドンを示す。

(B) TTGCCGATAGTAGCCCGCTCGAGCCGCGTC CCCTGGGTTATTAATACAGGCCCAAGCGC 60
M P I V A R S S R V P W V I K Y R P K R (20)
GTCGAAGATGTCGTTAACCAGGACCAGGCC AAGAAGATTCTAGTACCTGGTTCAAGGCA 120
V E D V V N Q D Q A K K I L V P W F K A (40)
TGGCTAGAGGGCAGGAAGCCGGATAAAAGG GCGGCCCTCCTCTACGGCCCGCCAGGCGTT 180
W L E G R K P D K R A A L L Y G P P G V (60)
GGTAAGACGAGCCTCGTGGAGGCTATAGCG AGCGAGTTCAACCTGGAGATGATAGAGCTA 240
G K T S L M E A I A S E F N L E M I E L (80)
AACGCCACGACTACAGAAGGAGGAGCGAT ATAGAGCGTATAGTCGGGGCCGCGTCCCGG 300
N A S D Y R R R S D I E R I V G A A S R (100)
AAGAGGAGCATGTTCAAGAGGGGCGTGTA ATACTGCTCGACGAGGTTGACGGGATAAAC 360
K R S M F K R G V V I L L D E V D G I N (120)
CCGAGAGAGGACGCGGGCGGTATAGAGGCT CTCCTCTCCGTCATAAAGACCACCGAGAAC 420
P R E D A G G I E A L L S V I K T T E N (140)
CCTATAGTCATGACCGCCAACGATCCGTGG AAAGACTTCCTCAGACCCCTCAGGGAAGTC 480
P I V M T A N D P W K D F L R P L R E V (160)
AGCCTAATGGTGGAGTTTAGGCCTTAACC CTGACCCACATAGTCGCGGTGCTCCAGAGG 540
S L M V E F R P L T L T H I V A V L Q R (180)
ATCTGTGAGGCTGAGAGGATAGAGTGCGAG AGAGAGGCCCTACGCTACATCGCTGAGAGG 600
I C E A E R I E C E R E A L R Y I A E R (200)
AGTGAGGGCGACCTCAGGTCCGCGATAAAC GACCTACAGGCAGTGCGCGAGGGCTATGGC 660
S E G D L R S A I N D L Q A V A E G Y G (220)
AGAGTCACTCTAACCTGGCCCCGTGAGATA GTGAGGGGTAGGGAGAAGAGCATAGACATC 720
R V T L T L A R E I V R G R E K S I D I (240)
TGGAGGACGCTGAACCAGGTGTTCTACAAG CCGAGGCAGGCGTGGATGGCGAGGAAGGCG 780
W R T L N Q V F Y K P R Q A W M A R K A (260)
GTTAGCCAGAGTGAGAAAGACTATGAGGAG CTGATAGCATGGATAAACGACAACATACCC 840
V S Q S E K D Y E E L I A W I N D N I P (280)
AGGAAGTACGGGGAGCCCTCTGACCTGTTC AGAGCCTTCGACGCCCTGGCGAGGGCGACA 900
R K Y G E P S D L F R A F D A L A R A T (300)
GTCTTCCTGGGCAGAGCCAAGTTCGGGGGC AACTGGGAGCTGCTTTCTGATGTTTTCGAC 960
V F L G R A K F G G N W E L L S Y V F D (320)
CTGATGGGCCCTGGGGTCGCCTACGCTAGG ATGGAGGGGGAGGTCCTCAAGACTAGGTAC 1020
L M G P G V A Y A R M E G E V L K T R Y (340)
TCCTACCCGAGAAGATCAGGATGATGGCT CAGCTAAGGGGGTTAGGGAGACTAGGGAG 1080
S Y P E K I R M M A Q L R G V R E T R E (360)
AAGCTGGCCGAGGTCTGGCTAAAAGACTC CTTATGAGCAGGAGAGCTGTTAAACAGAG 1140
K L A E V L A K R L L M S R R A V K T E (380)
GTGCTACCCATACTCCACTACATCTTCGG AGCTCCAGAGACCCTACTAAGCCTGCCATG 1200
V L P I L H Y I F R S S R D P T K P A M (400)
ATAGCCCTTGAGTACGGGCTAACGGAGAAG ATGGTCGAGCTTCTGGCGGGCCAGCGTAAA 1260
I A L E Y G L T E K M V E L L A G Q R K (420)
AGCGAGATTCTAAAGGCAATGGCCACCGTA AAGAAGGCGAGGCTAGGCGAGAAGCCCTA 1320
S E I L K A M A T V K K A R L G E K P L (440)
GAACCCAGGAAGCGAAAGCCAGGAGGAGA GGGGAGAAGGCTAGTAGAGATGAGGGTAGG 1380
E P Q E A K A R R R G E K A S R D E G R (460)
AAGGCGGGGAAAAGGAGAGAAAGGGCGTA GGCCTGGACTTCTCCTAGGTGAGCAATAA 1440
K A G K R E R K G V G L D F F L G E Q * (479)

Figure 2-2 *A. pernix*のRFCホモログの、ヌクレオチド配列及び予想されるアミノ酸配列 (前ページから続く)

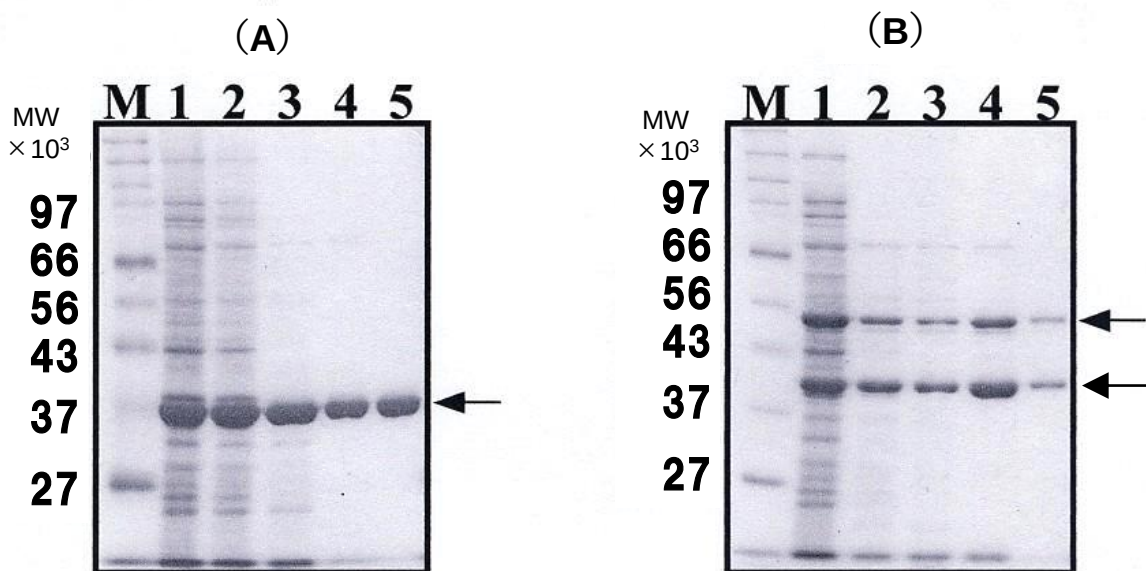


Figure 2-3 大腸菌中で発現させたApeRFCホモログの精製パターン

各工程のサンプルはすべて、10%濃度のSDS-PAGEで分画し、クーマシーブリリアントブルー溶液で染色した。分子量マーカー（Protein Marker, Broad Range、NEB社製）のサイズを、各パネルの左側に示した。また目的のRFCSまたはRFC複合体のバンドを、各パネルの右側より矢印で表した。組換えApeRFCSの精製工程：Lane M；分子量マーカー、Lane 1；超音波破碎した細胞抽出液、Lane 2；75℃で15分加熱した溶液の遠心上清、Lane 3；ポリエチレンイミン溶液で処理した後の遠心上清、Lane 4；HiTrap-Qによる溶出画分、Lane 5；HiTrap-Heparinによる溶出画分。(B) 組換えApeRFC複合体の精製工程：Lane M；分子量マーカー、Lane 1；超音波破碎した細胞抽出液、Lane 2；75℃で15分加熱した溶液の遠心上清、Lane 3；ポリエチレンイミン処理後の遠心上清、Lane 4；HiTrap-SPによる溶出画分、Lane 5；HiTrap-Qによる溶出画分。

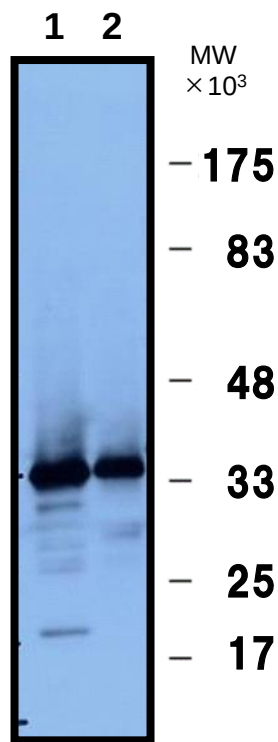


Figure 2-4 精製したApeRFCSサンプル及び*A. pernix*の細胞抽出液を用いたウエスタブロットティング
Lane 1 ; ApeRFCS、Lane 2 : *A. pernix*細胞抽出液を示す。
図の右側に分子量マーカの値を示した。

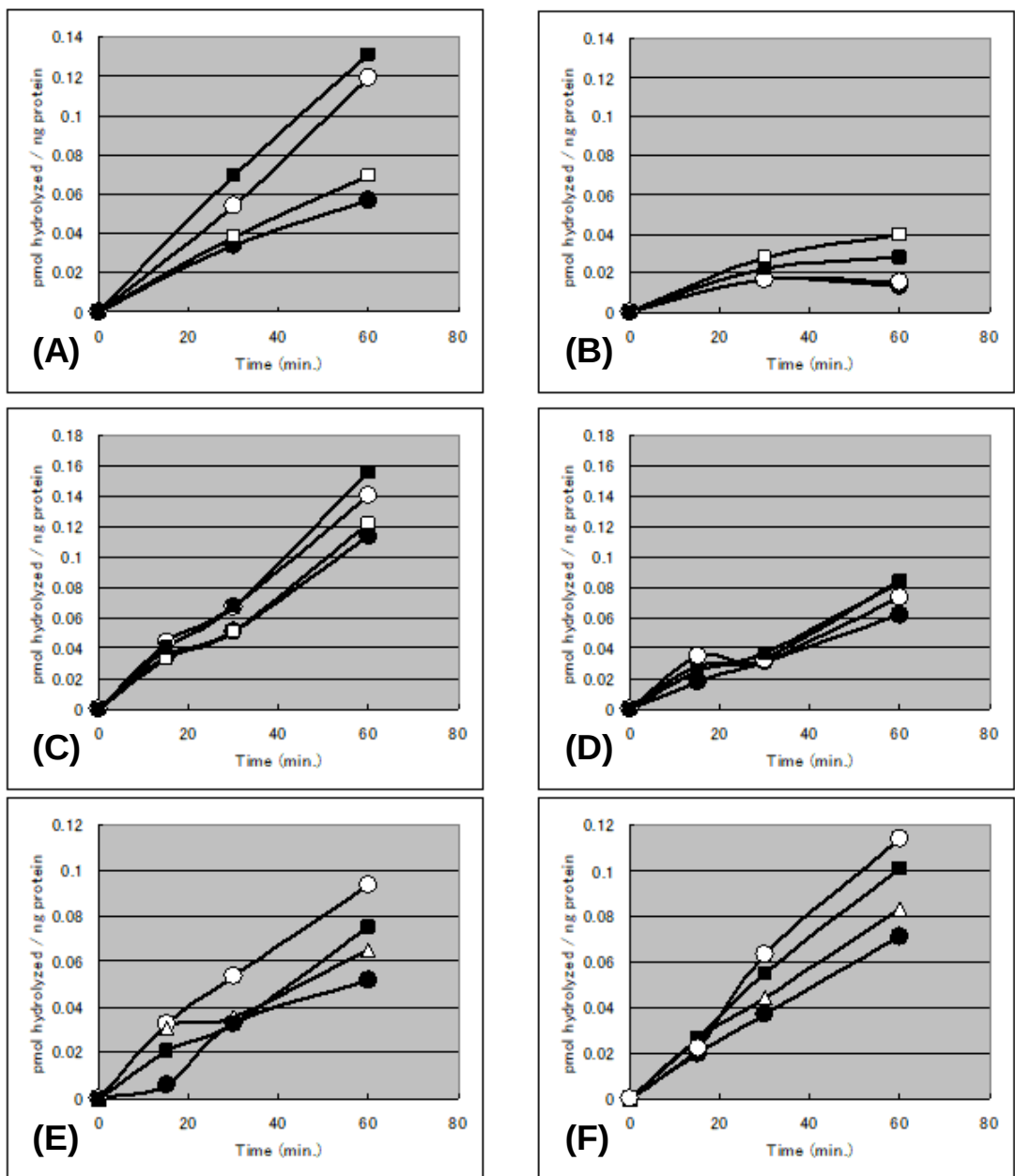


Figure 2-5 ApeRFC複合体及びRFCSのATPase活性

放射性同位元素として $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を使用し、精製したApeRFC複合体またはRFCSサンプルを、 70°C でインキュベートすることにより反応させた。また各種構造を持ったDNA及び精製した各ApePCNAを添加し、その挙動を確認した。表示した各反応時間の後、その一部を分取し、薄層クロマトグラフィーにより展開し、イメージアナライザーを用いてオートラジオグラムにより加水分解されたATPの量を定量した。各グラフの値は、バックグラウンドの数値を引いたものを示した。

(A) 及び (B) は、DNA及びApePCNAを添加したことによる効果を示し、(A) はApeRFC複合体、(B) はApeRFCSを示している。●；ApeRFC複合体またはRFCSタンパク質のみ、○；ssDNA、□；+ ApePCNA (2L+3)、■；+ ssDNA及びApePCNA (2L+3)。 (C) 及び (D) は、ApeRFC複合体に、各種のApePCNAを加えた時の効果を示し、(C) はssDNA存在下、(D) はNo DNAで実施した。●：No ApePCNA、□：+ ApePCNA1、○：+ ApePCNA2L、■：+ ApePCNA3。 (E) 及び (F) は、ApeRFC複合体に、各種の構造を持ったDNAを加えた時の効果を示し、(E) はApePCNA非存在下、(F) はApePCNA3を添加して実施した。●：No DNA、○：+ ssDNA、△：+ dsDNA、■：+ priDNA。

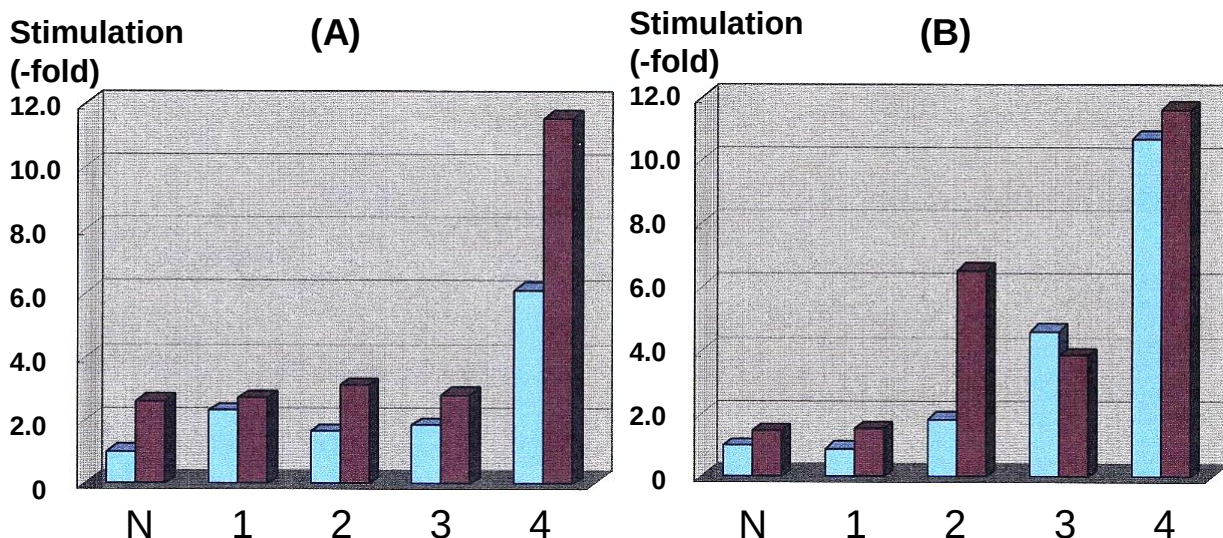


Figure 2-6 ApePCNA及びApeRFC複合体の存在／非存在下でのApePolI及びApePolIIIによるヌクレオチド取込み反応

(A) はApePolI、(B) はApePolIIIの結果を示す。M13環状DNAを鋳型として用い、ApeRFC存在下（赤色で示す）及びApeRFC非存在下（青色で示す）の条件で、各種ApePCNAを加えて反応させた。縦軸は、ApePCNA、ApeRFC複合体をいずれも加えなかったときの値を1.0とした際の相対値。横軸は、N：No PCNA、1：ApePCNA1、2：ApePCNA2L、3：ApePCNA3、4：ApePCNA2L+ApePCNA3をそれぞれ加えた生成物を示した。

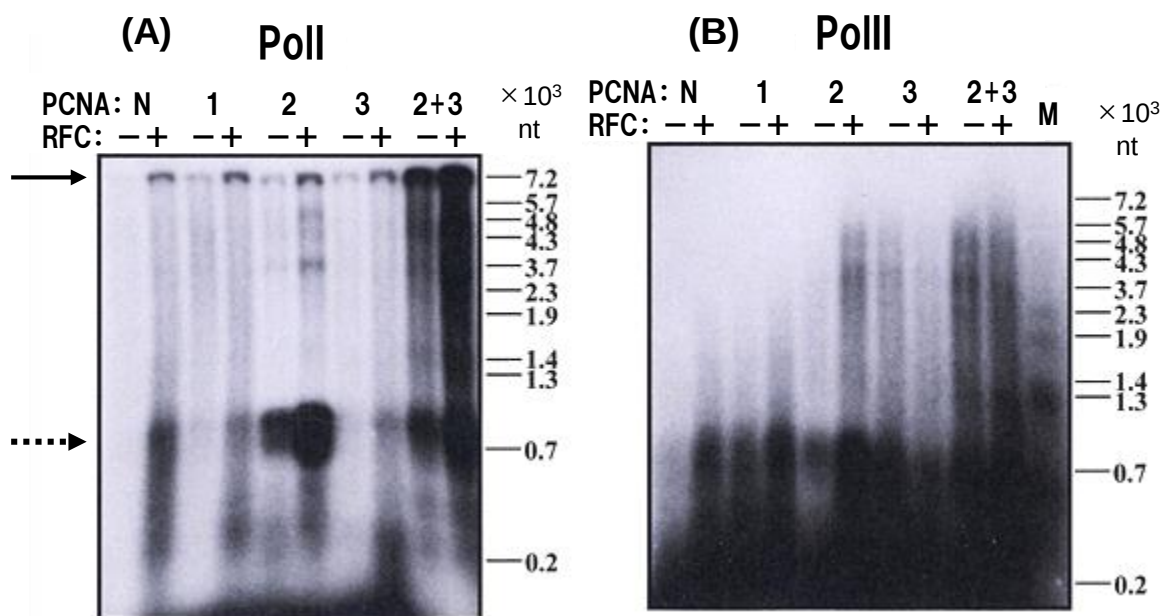


Figure 2-7 ApePCNA及びApeRFC複合体の存在／非存在下でのApePoll及びApePolIIIによるプライマー伸長反応

(A) はApePoll、(B) はApePolIIIの結果を示す。M13環状DNAを鋳型として用い、各ApePCNA並びにApeRFC複合体を加えて反応させ、生じた生成物をアルカリアガロースゲル電気泳動により視覚化した。Lane N；No PCNA、Lane 1；ApePCNA1、Lane 2；ApePCNA2L、Lane 3；ApePCNA3、Lane 2+3；ApePCNA2L+ApePCNA3をそれぞれ示している。各パネルの右側には、分子量マーカーとしてBstPIで切断した λ DNAのサイズ ($\times 10^3$ 塩基) を示した。

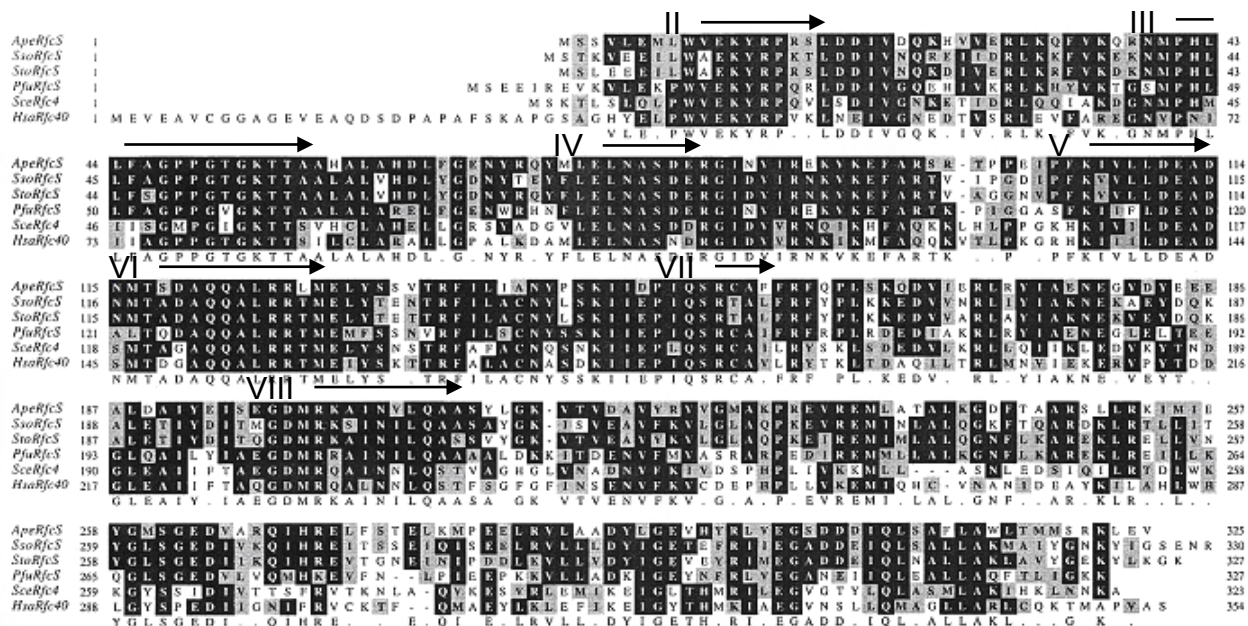


Figure 2-8 ApeRfcsと3種のアーキア、酵母及びヒトのRFC小サブユニットのアミノ酸配列のアライメント

同一のアミノ酸は黒地に白抜き文字で、類似のアミノ酸は灰色地で示した。予想されるRFCボックスを図中に矢印で表した。Ape : *A. pernix*, Sso : *S. solfataricus*, Sto : *S. tokodaii*, Pfu : *P. furiosus*, Sce : *S. cerevisiae*, Hsa : *H. sapiens*をそれぞれ示す。

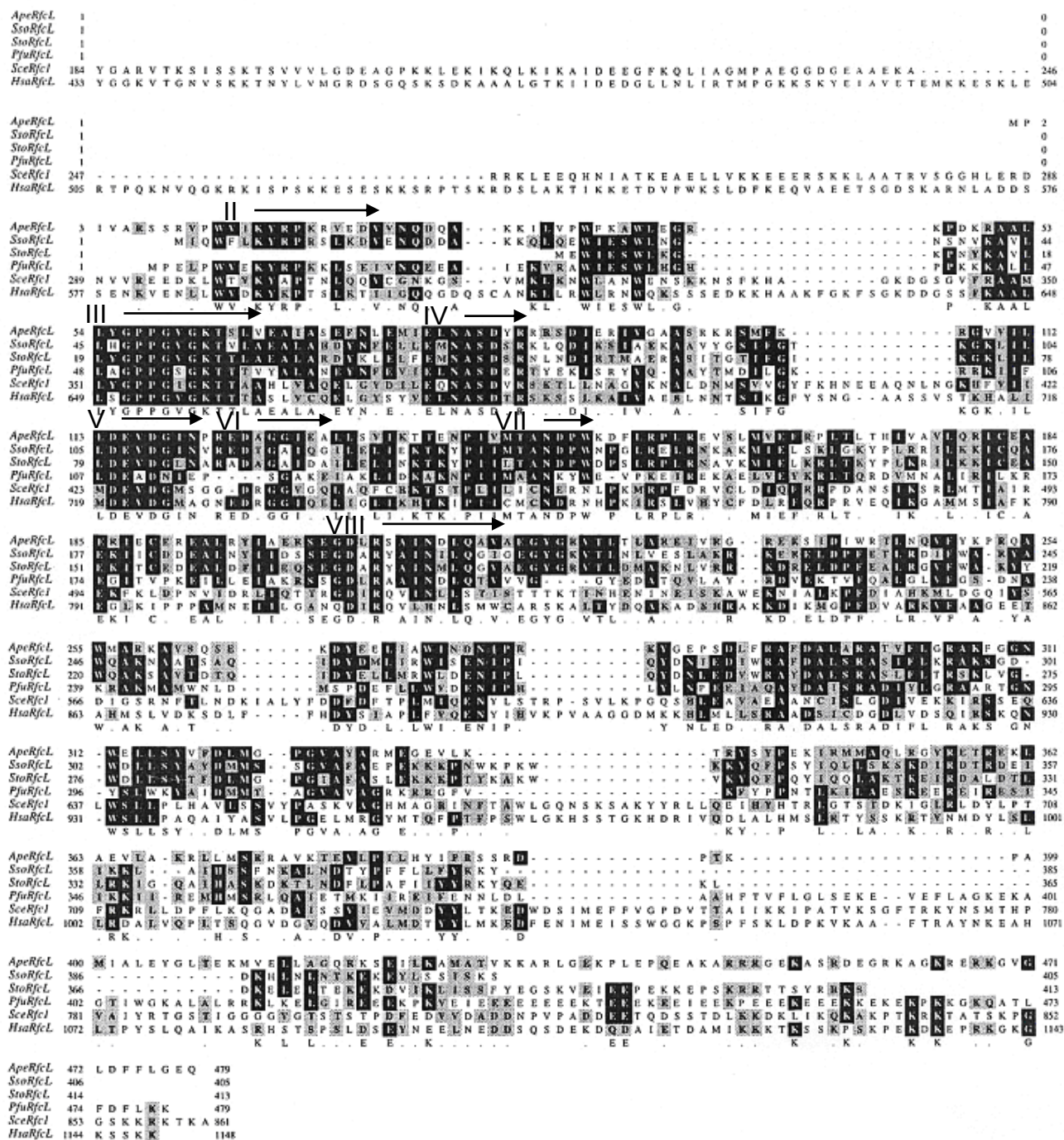


Figure 2-9 ApeRfCLと3種のアーキア、酵母及びヒトのRFC大サブユニットのアミノ酸配列のアライメント

同一のアミノ酸は黒地に白抜き文字で、類似のアミノ酸は灰色地で示した。予想されるRFCボックスを図中に矢印で表した。Ape : *A. pernix*、Sso : *S. solfataricus*、Sto : *S. tokodaii*、Pfu : *P. furiosus*、Sce : *S. cerevisiae*、Hsa : *H. sapiens*

Table 3-1 *A. pernix*の各DNAポリメラーゼのORFクローン化に用いたオリゴヌクレオチド

PolB1L-F	5'-dCGCGCATATGGGTAGTGGAGGTAAAAAGAGGAC-3'
PolB1M-F	5'-dCGCGCATATGAGGGTGAGAGGCGGACAAGAGGC-3'
PolB1S-F	5'-dCGCGCATATGGCCGGACCTGCTAAGCCTAAG-3'
PolB1-R	5'-dGGGGCGGCCGCTCACGAGTCGAAGAGGAGTCTATCTAG-3'
PolB3L-F	5'-dCGCGCATATGAAGGGTTCCGACGCTACACTCC-3'
PolB3S-F	5'-dCGCGCATATGAGGGGGTCAACCCCCGTTATC-3'
PolB3-R	5'-dGGGGCGGCCGCTTATTTCCCCCGCCTCATGAAGTCG-3'

Table 3-2 ApePolB3とPfuPolBのPCRフィデリティの比較

	Total colonies	Mutant colonies	Mutant frequency (mf) ^a	Error rate ^b
ApePolB3-1	9,810	966	0.0896	2.0×10^{-5}
ApePolB3-2	2,422	234	0.0881	2.0×10^{-5}
ApePolB3-3	2,065	361	0.1488	3.4×10^{-5}
ApePolB3-4	2,167	280	0.1144	2.6×10^{-5}
ApePolB3-5	2,923	396	0.1193	2.7×10^{-5}
PfuPolB-1	2,019	51	0.0246	4.5×10^{-6}
PfuPolB-2	1,929	23	0.0118	1.4×10^{-6}
PfuPolB-3	2,376	17	0.0071	2.5×10^{-7}
PfuPolB-4	2,900	20	0.0068	1.9×10^{-7}
PfuPolB-5	2,159	16	0.0074	3.1×10^{-7}
Background	3,599	22	0.0061	

各DNAポリメラーゼについて5回試験した結果を示す。a) Mutant Frequency (変異頻度、mf) は、現れた全コロニー数に対する変異体コロニー数の比で計算した。b) Error rate (変異比率、ER) は、以下の式で計算した。

$$ER = (\text{サンプルのmf} - \text{バックグラウンドのmf}) / (\text{塩基数} \times d)$$

ここで塩基数は増幅したlacZαのサイズ (345 bp)、dはテンプレートの倍加数 (12.0) を示す。テンプレートの倍加数は、以下の式で計算した。

$$2^d = (\text{PCR増幅物の量}) / (\text{開始時のサンプル量})$$

(A)

ggttaacacctgatttaactcagggtcaaattatccaggggtgctcgaaaagcc**t**tg ggt
G - H L I - L R L K L S R G A R K A **L** G
└───────────▶ PolB1L

agtggaggtaaagaggacatcgctagacgaaagcctcctcacatacataggttca
S G G K K R T S L D E S L L T Y I R S S

gtgaagggtgagaggcggacaagaggctgctcaagacaaggaaacctctctggactctgat
V R V R G G Q E A A Q D K E T S L D S D
└───────────▶ PolB1M

gaggaaaggggcaggagggggcttagacagacgacactactagattaac**a**tgaaccggacct
E E R G R R G L R Q T T L L D Y **M** A G P
└───────────▶ PolB1S

gctaagcctaagaaacctgaacctcctcccactctccaccgggagagagaacctgaaagc
A K P K K P E P P P T L H R E R E P E S

(B)

SD

ccccaatagaattggggggcggggtttgaagggttccgacgctacactcctctcctttcaa
P Q - N W G A G L K G S D A T L L S F Q

PolB3L

ctcctagacgtctcgtagagatgaggggggtcaacccccgttatcatactctggggggcgg
L L D V S Y E M R G S T P V I I L W G R

PolB3S

ggggctgacgggtctaggggttgctggttctacggcgagttcagaccctacttctacgtg
G A D G S R V V V F Y G E F R P Y F Y V

(A)はPolB1を、(B)はPolB3をそれぞれ示す。各のDNAポリメラーゼのN末端領域における、ヌクレオチド配列と予想されるアミノ酸配列を表す。開始コドンの候補をBoxで表し、本文中に記載した組換え体の名称を用いている。黒四角に白文字が今回報告する開始コドンであり、予想されるShine-Dalgarno配列をSDと記載した。

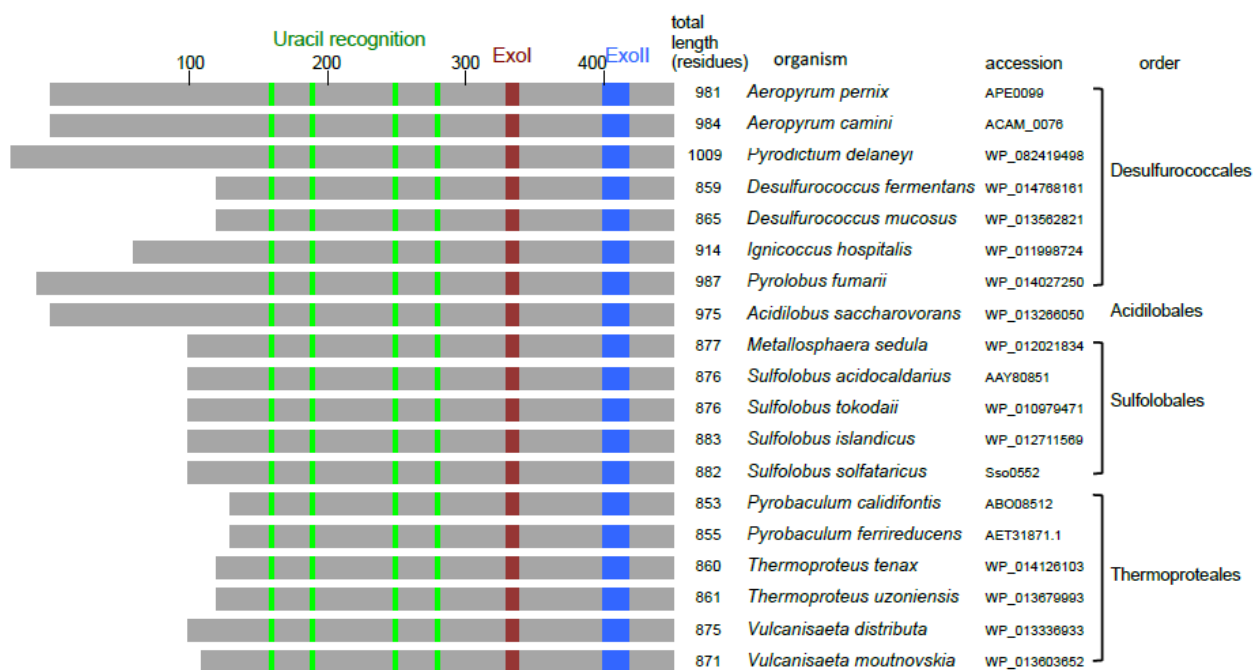


Figure 3-2 ApePolB1Lと他のクレンアーキオタのPolB1ホモログのN末端450残基の比較
 保存されている残基並びにモチーフについて、ウラシル認識部位を緑、エキソヌクレアーゼIを赤、エキソヌクレアーゼIIを青で示した。

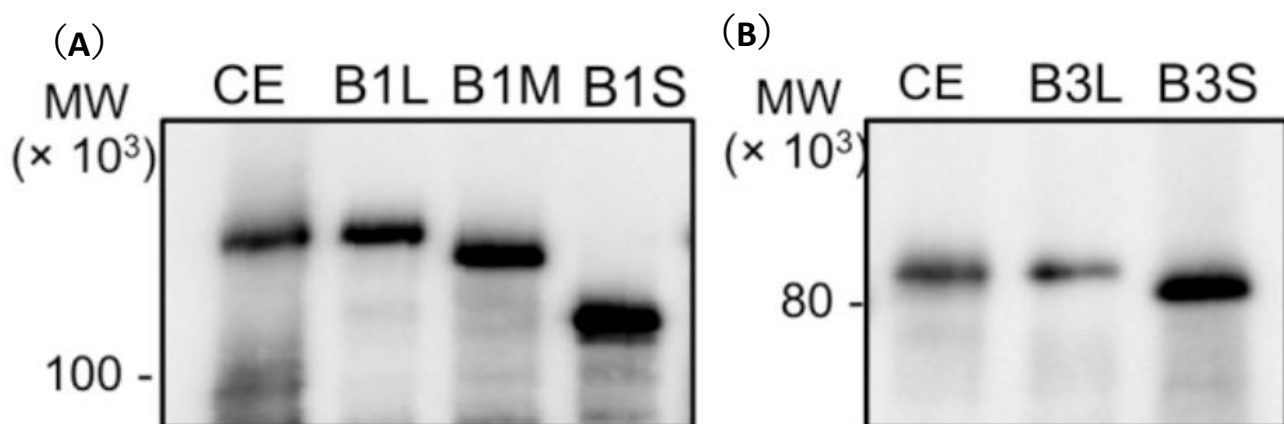


Figure 3-3 *A. pernix*のPolB1及びPolB3のウエスタンブロッティングによる泳動体の移動度評価
 (A) 抗PolB1抗体を使用し、PolB1の各タンパク質 (Lane B1L、B1M及びB1S) を検出した。
 (B) 抗PolB3抗体を使用し、PolB3の各タンパク質 (Lane B3L及びB3S) を検出した。Lane CEは、*A. pernix*の細胞抽出液75 μg を使用した。

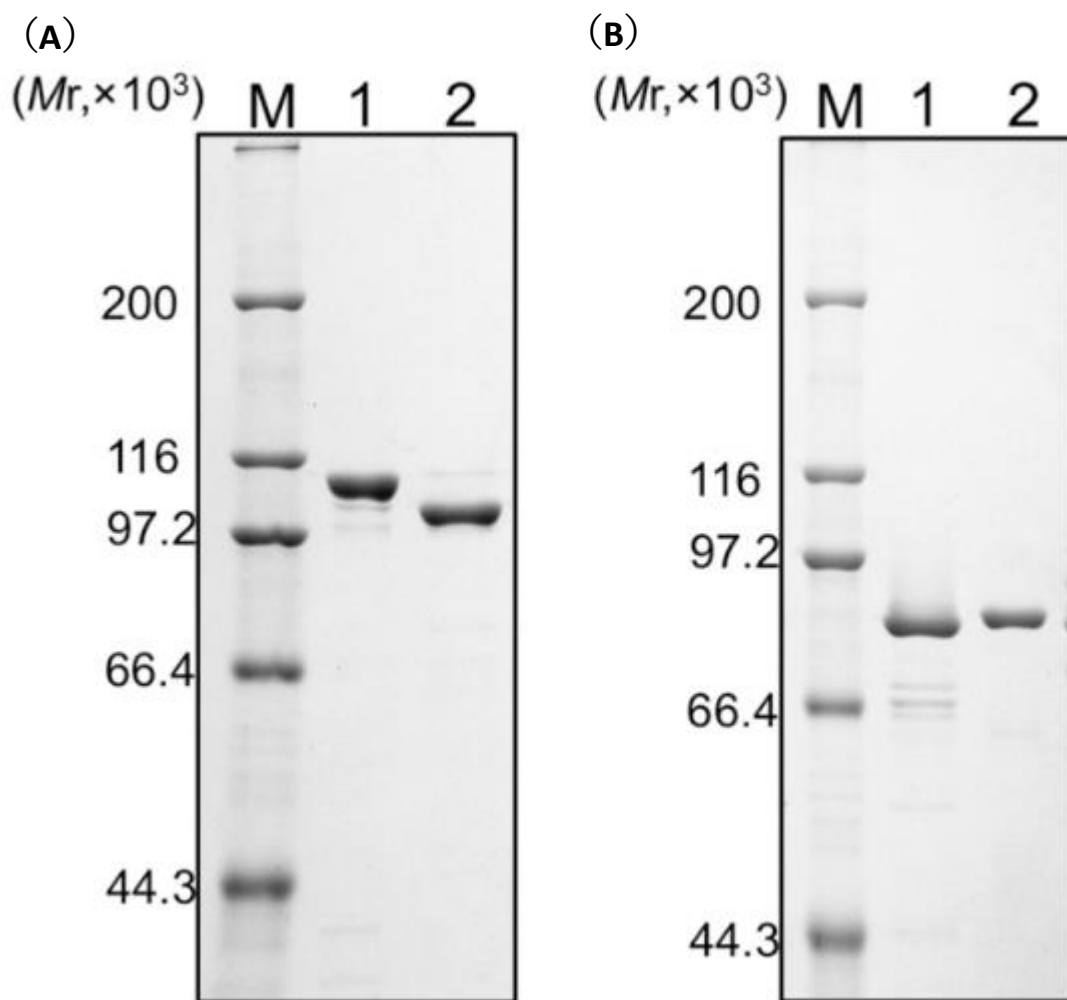


Figure 3-4 精製した各DNAポリメラーゼのSDS-PAGEによる泳動像

(A) はPolB1 (Lane 1がPolB1L、Lane 2がPolB1S) を、(B) PolB3 (Lane 1がPolB3S、Lane 2がPolB3L) を示す。各Laneあたり1 μ gのタンパク質を使用し、10%濃度のSDS-PAGEの後、CBB染色により視覚化した。各図の左側にサイズマーカーをLane Mと記載した。

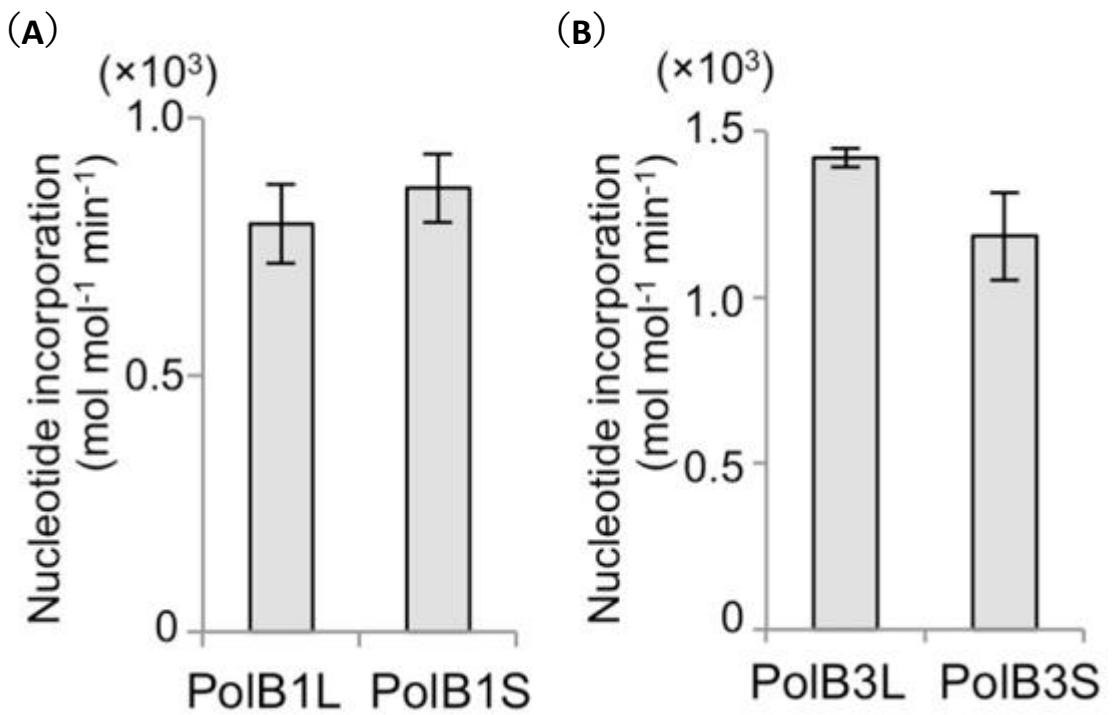


Figure 3-5 各ポリメラーゼのヌクレオチド取込み活性

(A) ではPolB1を20 nmol/L使用し、50°Cで3分反応させた。(B) ではPolB3を10 nmol/L使用し、70°Cで3分、6分及び9分反応させた。いずれも3試験の平均値及びその標準偏差を示した。

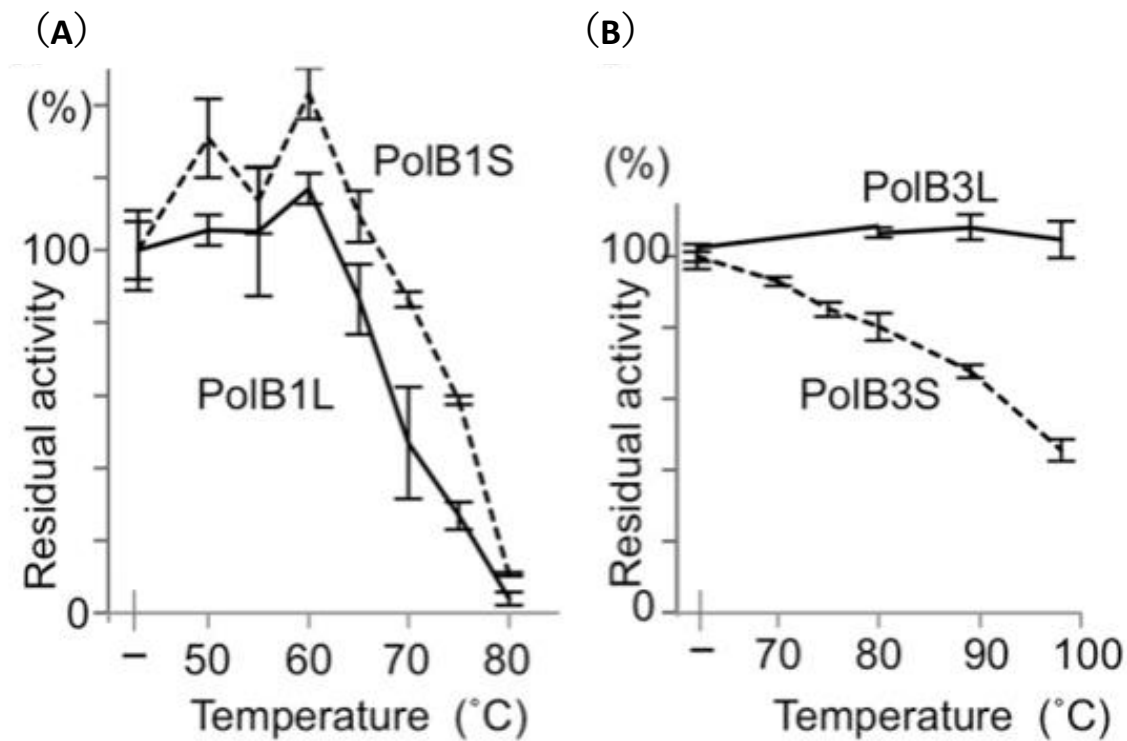


Figure 3-6 *A. pernix*のDNAポリメラーゼの耐熱性

(A) PolB1L及びPolB1Sは、各温度で5分間加熱処理した後、20 nmol/L使用し50°Cで2.5分反応させた。(B) PolB3L及びPolB3Sは、各温度で30分間加熱処理した後、10 nmol/L使用し70°Cで5分反応させた。いずれも3回試験し、その平均値及び標準偏差を示した。

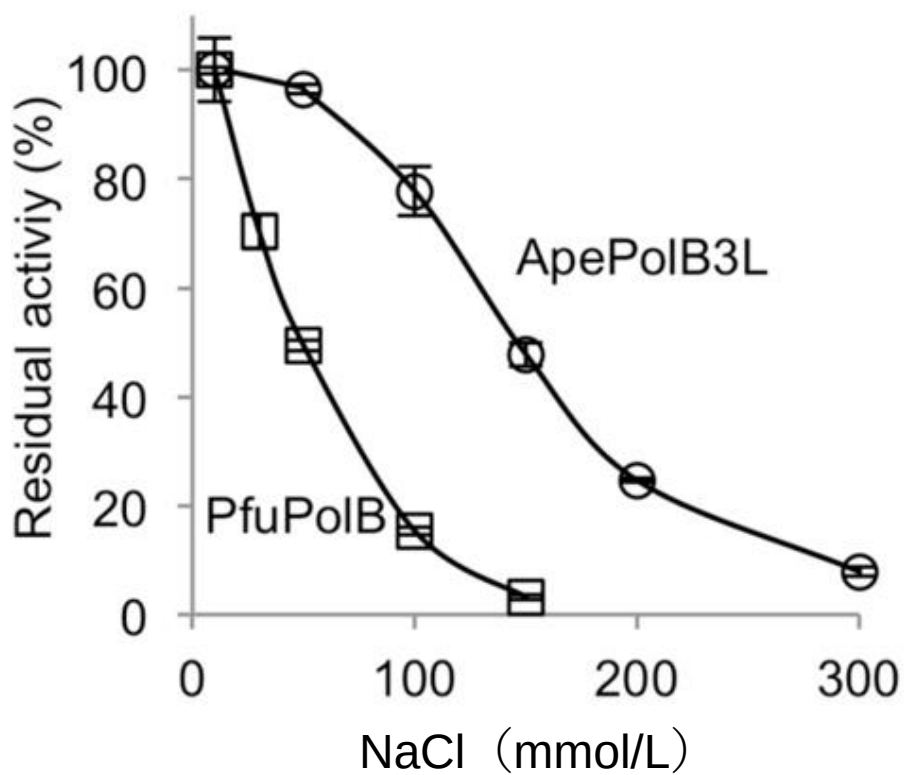


Figure 3-7 *A. pernix*及び*P. furiosus*のDNAポリメラーゼの耐塩性の比較
各NaCl濃度においてヌクレオチド取込み活性で評価した。ApePolB3L及び
PfuPolBいずれも20 nmol/L使用し、70°Cで5分反応させた。3回試験し、平
均値と標準偏差を示した。

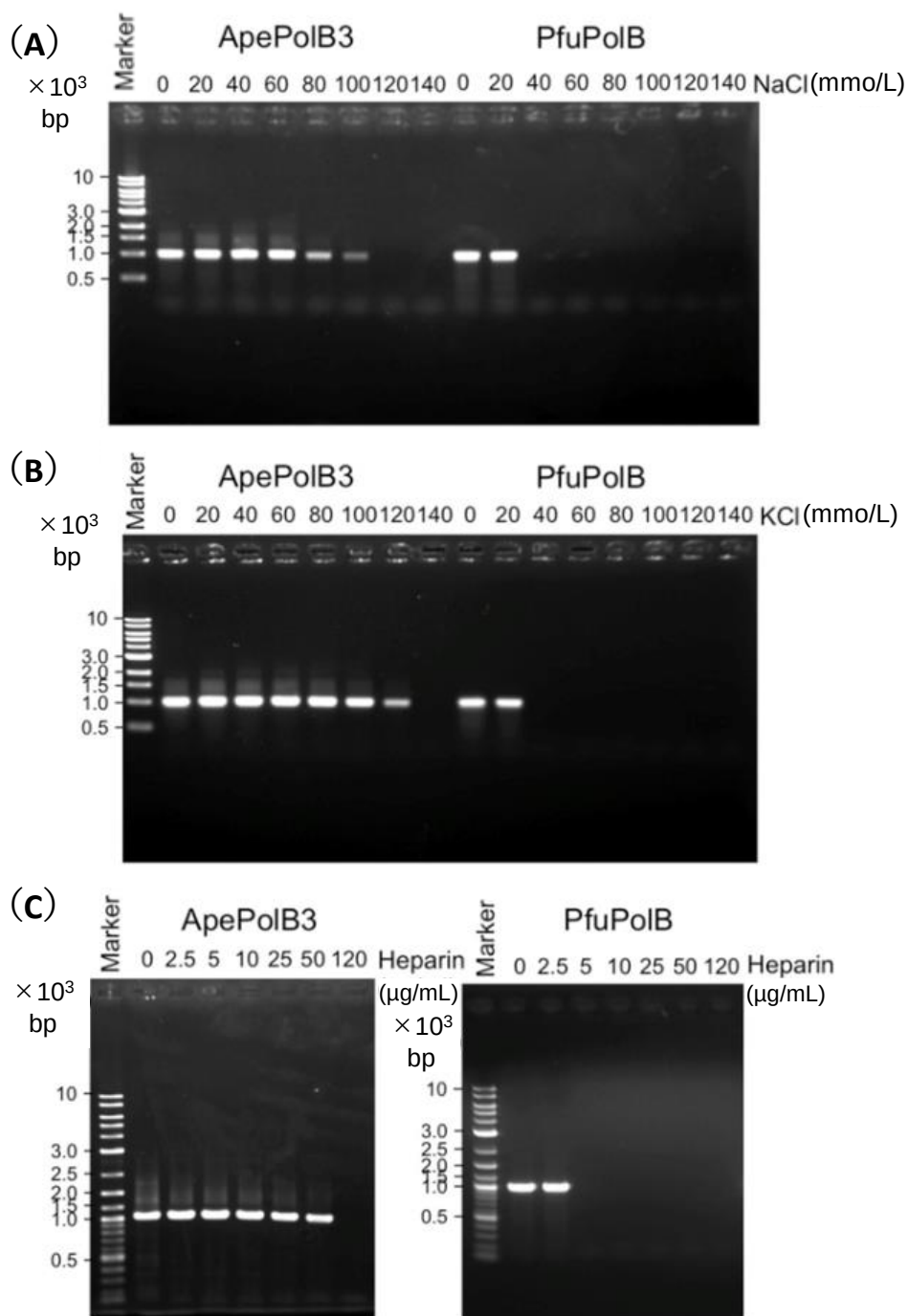


Figure 3-8 ApePolB3L及びPfuPolBのPCR活性

(A) NaCl濃度0～140 mmol/L、いずれのDNAポリメラーゼも20 nmol/L使用した。
 (B) KCl濃度0～140 mmol/L、いずれのDNAポリメラーゼも20 nmol/L使用した。
 (C) ヘパリン濃度0～120 $\mu\text{g/mL}$ 、いずれのDNAポリメラーゼも30 nmol/L使用した。
 基質として λ DNA 0.8 ngを使用し、PCR反応はいずれも30サイクル行った。

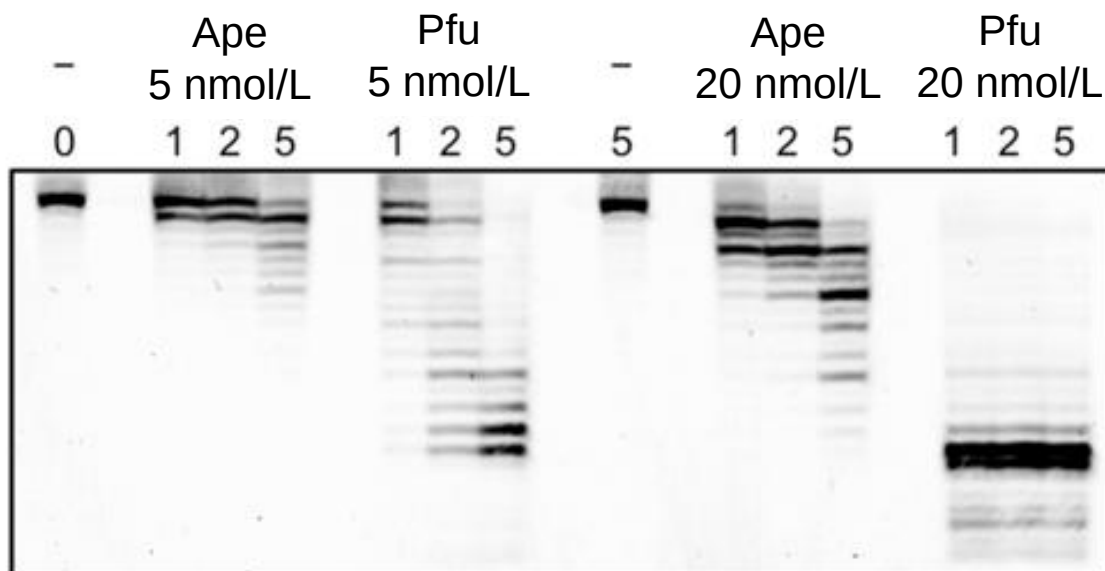


Figure 3-9 ApePolB3L (Ape) 及びPfuPolB (Pfu) のエキソヌクレアーゼ活性の比較

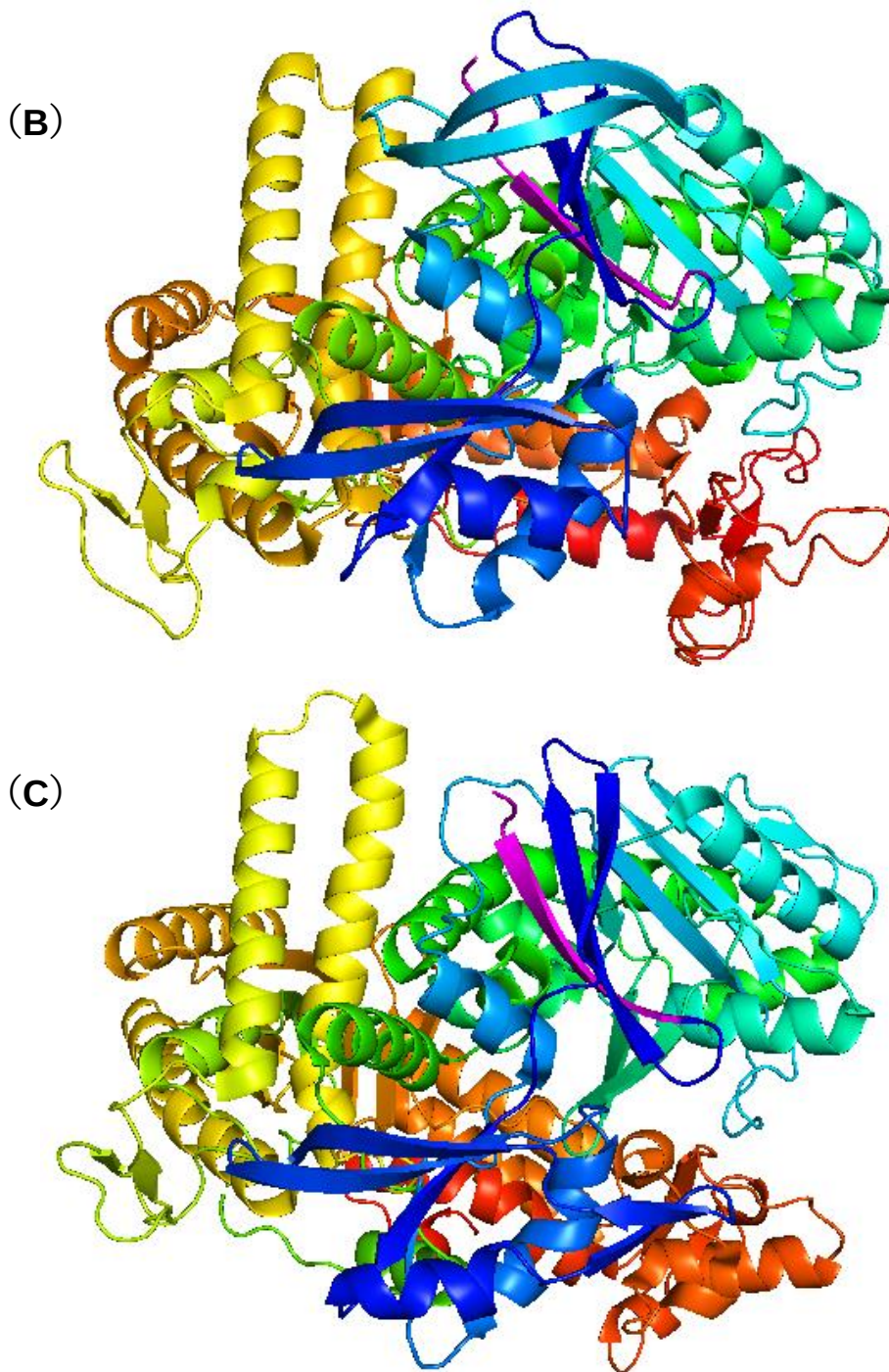
いずれのDNAポリメラーゼも5 nmol/L及び20 nmol/L使用し、dNTPを含まないPCR反応液中で、70°Cで反応させた。1分、2分及び5分で反応液を一部取り出し、20 mmol/L-EDTA及びFormamideで反応を停止した。得られたサンプルを、8 mol/L尿素を含む12%-PAGEにかけ、得られたゲルをTyphoon Trioイメージャー (GE Healthcare社製) で視覚化した。反応基質として10 nmol/L濃度のCy5ラベルしたプライマーDNAを使用した。

[illegible]

Ape	184	L R V M A F	D I E V Y	242	S I D P D V I V G Y	N Q N R	F D W P Y	577	V I Y G D T D S L F
Sso	166	L R T I G V	D F Q I Y	224	N Y D P D I I F V Y	D S D L	L P W K Y	537	V I L A N D L L I F
Poc	181	M R L V A F	D I E V Y	239	A F D P D I V G Y	N S N H	F D W P Y	576	V I Y G D T D S L F
Pfu	135	L K I L A F	D I E T L	200	E K D P D I V T Y	N G D S	F D F P Y	537	V L Y I D T D G L Y
Tgo	135	L K M L A F	D I E T L	200	E K D P D V L I T Y	N G D N	F A F A Y	536	V L Y A D T D G F Y

左側の数字は、いずれもN末端からの残基数を示す。Ape : *A. pernix* (NP_148383.2)、Sso : *S. solfataricus* P2 (NP_241651.1)、Poc : *P. occultum* (BAA07580.1)、Pfu : *P. furiosus* WP_011011325.1、Tgo : *Thermococcus gorgonarius* WP_088885078.1を表している。(A) DNAポリメラーゼB3のN末端付近の配列。ウラシル認識部位として保存されている領域を青で示した。アスタリスクはこれまでのN末端残基である。(B) エキソヌクレアーゼ活性モチーフとして保存されている配列を黄色で示す。

Pca								M	R	F	W	P	L	D	A	T	Y	S	V	V	G	G	V	P	17	
Ape	M	K	G	S	D	A	T	L	L	S	F	Q	L	L	D	V	S	Y	E	M	R	G	S	T	P	25
Pab												M	I	I	D	A	D	Y	I	T	E	D	G	K	P	14



(A) *Pyrobaculum caldifontis* (Pca)、*A. pernix* (Ape) 及び *Pyrococcus abyssi* (Pab) の family B DNAポリメラーゼのN末端アミノ酸配列の比較。Pca及びPabのN末端領域を紫に着色した。右側の数字は、いずれもN末端からの残基数を示す。(B) *P. caldifontis* family B DNAポリメラーゼの立体構造 (PDB: 5MDN)。(C) *P. abyssi* family B DNAポリメラーゼの立体構造 (PDB: 4FLT)。*A. pernix*の配列はNP_148383.2を参照した。

(A)

Ape	L	Y	G	H	-	-	-	Y	S	V	S	G	R	L	N	V	D	L	L	D	F	A	E	E	305
Sso	T	Y	G	H	-	-	-	Y	S	I	S	G	R	L	N	V	D	L	T	G	L	L	V	N	288
Poc	V	Y	G	H	-	-	-	V	S	V	Q	G	R	L	N	V	D	L	Y	D	Y	A	E	E	303
Tko	R	M	G	D	R	F	A	V	E	V	K	G	R	I	H	F	D	L	Y	P	V	I	R	R	266
Tgo	R	M	G	D	R	F	A	V	E	V	K	G	R	I	H	F	D	L	Y	P	V	I	R	R	266
Pfu	R	I	G	D	M	T	A	V	E	V	K	G	R	I	H	F	D	L	Y	H	V	I	T	R	266

(B)

Ape	W	R	R	Q	I	R	S	E	M	K	K	H	P	P	D	S	515
Sso	V	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	S	482
Poc	L	R	R	Q	V	K	E	K	M	K	E	F	P	P	D	S	514
Tko	E	R	Q	K	I	K	K	K	M	K	A	-	T	I	D	P	473
Tgo	E	R	Q	K	V	K	K	K	M	K	A	-	T	I	D	P	473
Pfu	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	-	T	Q	D	P	474

Ape	P	E	Y	K	L	L	D	E	R	Q	K	A	I	K	L	L	531
Sso	N	K	I	K	V	I	E	E	-	-	-	-	-	-	-	L	491
Poc	P	E	Y	R	L	Y	D	E	R	Q	K	A	L	K	V	L	530
Tko	I	E	R	K	L	L	D	Y	R	Q	R	A	I	K	I	L	489
Tgo	I	E	K	K	L	L	D	Y	R	Q	R	A	I	K	I	L	489
Pfu	I	E	K	I	L	L	D	Y	R	Q	K	A	I	K	L	L	490

Figure 3-12 アーキアのDNAポリメラーゼの活性に関わる領域周辺のアライメント

(A) 各ポリメラーゼ中のフォークドポイント領域付近のアミノ酸配列。この領域中に多く見られるArg残基を緑色で示す。(B) フィンガーサブドメイン領域周辺のアミノ酸配列。ポリメラーゼの活性部位に近い配置を持つと考えられるArg及びLys残基を緑色で表す。Ape、Sso、Poc、Tko、Tgo及びPfuは、*Aeropyrum pernix*、*Sulfolobus sulfataricus*、*Pyrodictium occultum*、*Thermococcus kodakaraensis*、*Thermococcus gorgonarius*及び*Pyrococcus furiosus*をそれぞれ示している。各配列の右側には、アミノ酸残基数を表記した。