

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 :

氏 名：大門 克哉

論文題名：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

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、アーキアにおけるゲノム DNA 複製機構に着目し、超好熱好気性のアーキアである *Aeropyrum pernix* が有する 2 種類の DNA ポリメラーゼとその相互作用因子について、生化学的性質解析を行い、作用機序の理解をまとめたものである。*A. pernix* はクレンアーキオタ門に属するアーキアであり、至適増殖温度が 90~95°C である超好熱菌である。

第一章において著者は *A. pernix* のゲノム中に見られた 3 種の PCNA ホモログと、2 種の DNA ポリメラーゼとの相互作用について以下のことを明らかにした。まず、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製し、ウエスタンブロッティングによっていずれの PCNA も *A. pernix* の細胞中で産生されていることを示した。次に、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、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することを示した。各抗体を用いて PCNA の免疫沈降実験を行うことによって、PCNA1 と PCNA2 のペア及び、PCNA2 と PCNA3 のペアが相互作用しうることを明らかにした。そして、PCNA2 と PCNA3 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、PolIII の方が PolII よりも顕著であった。すなわち、*A. pernix* PCNA がヘテロ複合体として機能し、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ることを示した。

第二章において著者は、*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た。2 種の RFC タンパク質 (RFCS, RFCL) から構成される RFC 複合体は ATPase 活性を持ち、ssDNA を加えると、その活性は約 2 倍に増大した。また PCNA を加えた時も 1.5 倍程度増大した。DNA ポリメラーゼの PCNA 依存的 DNA 鎖伸長反応に RFC 複合体を添加することによって、PolII, PolIII どちらの場合も、伸長反応は促進されることを示した。

第三章において著者は、2 種の DNA ポリメラーゼの遺伝子配列を見直し、正確な構造遺伝子の特定を試みた。その結果、新たな翻訳開始コドンの候補を複数個見つけて、それらから翻訳が開始される読み枠に基づいて組換えタンパク質を調製した。これらの新たな DNA ポリメラーゼタンパク質を、第一章、第二章で用いた DNA ポリメラーゼと比較しながら性質解析した結果、PolB1 (PolII)、PolB3 (PolIII) とともに、N 末端領域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。しかし、PolB3 は N 末端領域が延びたことによって、大幅に耐熱性の向上が見られ、PCR 酵素として利用可能なまでの安定性を示した。さらに、この PolB3L は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であり、不純物を多く含む試料からの目的 DNA 増幅に適した PCR 酵素として利用できることを示した。この酵素は今後実用化されて、広く範囲での利用が期待される。