

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			
論文名	超好熱性アーキア <i>Aeropyrum pernix</i> 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			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	石野 良純
	副査	九州大学	教授	角田 佳充
	副査	九州大学	准教授	石野 園子
	副査	九州大学	准教授	西本 悦子

論文審査の結果の要旨

本論文は、アーキアにおけるゲノム DNA 複製機構に着目し、クレンアーキオタ門に属する超好熱好気性のアーキアの一つで、至適増殖温度が 90~95°C 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。

第一章では、*A. pernix* のゲノム中に存在する 3 種の Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ホモログ遺伝子をクローニングし、発現させて精製した。この組換えタンパク質標品を用いて、それぞれの PCNA に対する抗体を作製し、ウエスタンブロット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証明した。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。また、それぞれの PCNA に対する各抗体を用いて免疫沈降実験を行うことによって、PCNA1 と PCNA2 および、PCNA2 と PCNA3 がそれぞれ相互作用しうることを明らかにした。そして、PCNA2 と PCNA3 を共存させると、それぞれ単独の時よりも著しく DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応が促進されることを示した。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。このような性質は報告例がなく、*A. pernix* に特有のものである。

第二章では、*A. pernix* のゲノム中に見出された Replication Factor C (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 DNA 依存的な ATPase 活性を有することを示した。さらに DNA ポリメラーゼの PCNA 依存的プライマー伸長反応に 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。これらの結果は RFC が *A. pernix* 細胞中で実際に PCNA を DNA 鎖上に乗せるクランプローダーとして機能することを示している。

第三章においては、*A. pernix* のゲノム配列を見直し、2 種の DNA ポリメラーゼの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構造遺伝子候補に基づいてそれぞれの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、PolB3 (一・二章ではそれぞれ PolII、PolIII と記述) 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いものの、PolB3 は PolIII よりも N 末端領域が 19 アミノ酸延びたことによって大幅に耐熱性が向上し、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 PolB3 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った。そして実際に、高濃度の NaCl やヘパリンを含む反応液中で PCR が進行することを示した。これらの結果から、PolB3 には不純物を多く含む試料からの目的 DNA 増幅に適した PCR 酵素としての実用化が期待される。

以上要するに、本論文は超好熱性アーキア的一种である *A. permix* 由来の DNA 複製因子の性質について詳細な生化学的解析を行い、アーキアの複製機構に関する理解を進めると共に、実用的な PCR 酵素としての性能を有する DNA ポリメラーゼを発見したものであり、極限環境生物学および遺伝子工学の進歩に寄与する価値ある業績と認める。

よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。