

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* 由来 ファミリーD DNAポリメラーゼの研究：高純度精製 法の確立と構造-機能解析

高島，夏希

<https://hdl.handle.net/2324/2236307>

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 *Thermococcus kodakarensis* 由来

ファミリーD DNA ポリメラーゼの研究

～高純度精製法の確立と構造-機能解析～

高 島 夏 希

2019

要旨

DNA ポリメラーゼはその配列の相同性から七つのファミリーに分類される。ファミリーD DNA ポリメラーゼはアーキア特有の酵素であり、クレンアーキオタ以外のサブドメインでホモログ遺伝子が見つかる。アーキアのサブドメインの一つであるユリアーキオタにおいて、ファミリーB DNA ポリメラーゼとファミリーD DNA ポリメラーゼは複製ポリメラーゼとして、それぞれリーディング鎖とラギング鎖の合成に関与していると考えられてきた。ファミリーD DNA ポリメラーゼはいくつかの種のアーキアにおいて研究されており、基本的な性質は共通しているが、種ごとに性質が異なっている部分もある。また、ファミリーD DNA ポリメラーゼの立体構造情報について、各サブユニットの部分構造は報告されているが、全体の構造情報はまだ得られていない。この理由の一つに、ファミリーD DNA ポリメラーゼ複合体および各サブユニットの精製が困難であり、安定で高純度なタンパク質が得られないことがある。

筆者は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のファミリーD DNA ポリメラーゼ構成タンパク質である TkoDP1、TkoDP2 および両者の複合体である TkoPolD の調製法を詳細に検討した。TkoDP1 は昆虫細胞 Sf9 で産生させることによって、タンパク質の分解を抑制することができ、TkoDP2 および TkoPolD は陰イオン交換カラムに ENrich™ Q 5/50 カラムを用いることによって、各タンパク質を高純度に調製することができた。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよび静的光散乱による解析の結果から、TkoDP1、TkoDP2 は溶液中でそれぞれ単量体として存在し、試験管内で混合することによって効率良く再構成された。また、TkoPolD は TkoDP1 と TkoDP2 それぞれ一分子ずつから成るヘテロ二量体であることが示唆された。さらに、電子顕微鏡による単粒子解析の結果、TkoPolD 分子が球形ではなく扁平な構造をとっていることがわかった。TkoDP1 および TkoDP2 は DNA 合成活性、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に重要な役割を担い、単独では両活性とも示さないが、複合体を形成して初めて顕著な活性を示した。また、DNA 結合活性について、TkoDP1 は DNA に対する親和性が極めて低く、TkoDP2 は DNA との結合活性を示した。このことより TkoPolD の DNA 結合は TkoDP2 が担っていることが示唆された。本研究は、高純度な TkoDP1、TkoDP2 および TkoPolD の調製方法を確認し、初めてファミリーD DNA ポリメラーゼ構成サブユニットの DNA 結合活性を明らかにした。また、ファミリーD DNA ポリメラーゼの高次構造を、複数の測定方法を組み合わせて推測し、その結果を合わせてヘテロ二量体であると決定した。これらの結果はファミリーD DNA ポリメラーゼについての理解に大きく貢献するものであると考える。

DNA polymerases are classified into 7 families based on the amino acid sequence similarity. Family D DNA polymerase (PolD) was originally discovered from *Pyrococcus furiosus*. Its amino acid sequence showed no homology with any known DNA polymerases, and family D was proposed as a new family of DNA polymerases. One each of the family B DNA polymerase (PolB) and PolD are generally found in Euryarchaeota, a subdomain of Archaea. Both Pols had been considered to be essential for replication process, in which PolB and PolD play leading strand synthesis and lagging strand synthesis, respectively. PolD was studied in several species of Archaea. Although some of the basic characteristics of PolD were common, there are some of differences in each PolD. PolD is composed of the small subunit (DP1) and the large subunit (DP2). Recently, partial crystal structures of DP1 and DP2 were solved using the truncated proteins for DP1 and DP2, respectively, from *Pyrococcus abyssi*. However, the whole PolD complex structure has not been reported yet and the structure-functions relationships of the family D DNA polymerase are still mysterious. The reason for the difficulty of the structural analysis of PolD is that preparation of the highly purified PolD protein has not been easy for many years from any source.

In this study, I tried to establish methods to prepare the highly purified DP1, DP2 and PolD from *T. kodakarensis*. Using these proteins, I investigated basic properties of TkoPolD. No distinct activity was detected from the individual proteins of TkoDP1 and TkoDP2, but was detected from the mixture of the purified TkoDP1+DP2 and also from TkoPolD produced by a coexpression system. A maximum activity was detected from the mixture of TkoDP1+DP2 with equal ratio. Oligomeric state of TkoPolD in solution, analyzed by gel filtration and static light scattering, showed that TkoPolD forms a complex of TkoDP1 and TkoDP2 with 1:1 ratio. In addition, TkoDP1 showed no affinity to any structure of DNAs. TkoDP2 and TkoDP1+DP2 bound the primed DNA and the dsDNA. These results suggest that TkoDP2 is mainly responsible to bind DNA, but both TkoDP1 and TkoDP2 are essential to construct an active form, in which active sites for exonuclease and polymerase are located mainly in TkoDP1 and TkoDP2, respectively. My study will contribute to the understandings of fundamental structure and properties of PolD, the archaea-specific DNA polymerase.

略語

BSA,	bovine serum albumin
CV,	column volume
DP1,	family D DNA polymerase small subunit
DP2,	family D DNA polymerase large subunit
DP1+DP2	reconstitution of family D DNA polymerase <i>in vitro</i>
DPM,	disintegration per minute
FBS,	fetal bovine serum
FEN-1,	flap endonuclease-1
GINS	Go-Ichi-Ni-San, complex of Gins51 and Gins23 protein in archaea
IPTG,	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
K_D ,	dissociation constant
LB,	Luria Broth, or Luria-Bertani
MCM,	minichromosome maintenance protein complex
MOI,	multiplicity of infection
M_r ,	relative molecular mass
MW,	molecular weight
OB-fold,	oligonucleotide/oligosaccharide binding-fold
OD ₆₀₀ ,	optical density at wave length 600 nm
PCNA,	proliferating cell nuclear antigen
PIP box,	PCNA-interacting protein box
PolB,	family B DNA polymerase
PolD,	family D DNA polymerase
Pol α ,	DNA polymerase α
Pol δ ,	DNA polymerase δ
Pol ϵ ,	DNA polymerase ϵ
Pol ζ ,	DNA polymerase ζ
RFC,	replication factor C
Sf,	<i>Spodoptera frugiperda</i>
S/N,	signal-noise ratio or signal-to-noise ratio
SPR,	surface plasmon resonance

TkoPolD, PfuDP1, PabPolB, etc, the protein from the indicated species; the first uppercase letter and the second two lower case letters indicate organism's name, whose first letter from genus name followed by first two letters from species (e.g. Tko indicates *Thermococcus kodakarensis*).

目次

要旨.....	1
略語.....	3
緒論.....	7
本論.....	13
第一章 ファミリーD DNA ポリメラーゼの精製方法の確立.....	13
1.1. 序論.....	13
1.2. 材料と方法.....	16
1.2.1. 培地および溶液組成一覧.....	16
1.2.2. 各タンパク質産生用コンストラクトの作製.....	16
1.2.3. 各タンパク質の産生方法.....	19
1.2.4. 各タンパク質の精製.....	21
1.2.5. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性測定.....	25
1.3. 結果.....	26
1.3.1. TkoDP1(D473A H475A) の変異導入部位の検討.....	26
1.3.2. TkoDP1 の精製.....	26
1.3.3. TkoDP2 の精製.....	28
1.3.4. TkoPolD および変異体 TkoPolD の精製.....	29
1.3.5. 精製タンパク質の純度の検定.....	31
1.3.6. 大腸菌および昆虫細胞で産生させた TkoDP1 の活性の差.....	31
1.4. 考察.....	32
1.4.1. TkoDP1 の精製方法.....	32
1.4.2. TkoDP2 の精製方法.....	33
1.4.3. TkoPolD の精製方法.....	34
1.4.4. 精製タンパク質の純度の評価.....	35

第二章 ファミリーD DNA ポリメラーゼの生化学解析..... 36

2.1. 序論.....	36
2.2. 材料と方法.....	38
2.2.1. 反応溶液組成一覧	38
2.2.2. TkoDP1+DP2 の試験管内再構成条件	38
2.2.3. ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の測定	38
2.2.4. 静的光散乱による重量平均分子量測定の原理	38
2.2.5. 静的光散乱による絶対分子量の測定	41
2.2.6. TkoDP1 の天然変性領域の予測.....	41
2.2.7. TkoDP1 の予測天然変性領域の CD スペクトル測定	42
2.2.8. 透過型電子顕微鏡による単粒子解析	42
2.2.9. 基質 DNA の調製	43
2.2.10. ヌクレオチド取込み活性の測定	43
2.2.11. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の測定	44
2.2.12. DNA 結合活性の測定	45
2.3. 結果.....	47
2.3.1. ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の測定	47
2.3.2. 静的光散乱による絶対分子量の測定	47
2.3.3. TkoDP1 アミノ酸配列からの天然変性領域の予測.....	47
2.3.4. TkoDP1 N 末端フラグメントの作製と CD スペクトルの測定	48
2.3.5. ヌクレオチド取込み活性の測定	48
2.3.6. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の測定	48
2.3.7. DNA 結合活性の測定	50
2.3.8. 電子顕微鏡による単粒子解析	50
2.4. 考察.....	52
2.4.1. 多量体構造	52
2.4.2. ポリメラーゼ活性	54
2.4.3. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性	57
2.4.4. DNA 結合活性	62

2.4.5. 立体構造	65
結論.....	69
謝辞.....	72
発表論文.....	73
引用文献.....	74
図表.....	83

緒論

近年、これまでは生物が生息していなかったと思われていた深海の熱水噴出孔や高塩濃度の死海、温泉の源泉などの極限環境から様々な生物が発見、単離されてきた。1977 年、Woese と Fox は生物を系統学的に分類することを目的に、小サブユニットリボソーム RNA の構造をオリゴヌクレオチドカタログ法によって調べることににより、生物の進化系統学的解析を行った。その結果、原核生物であるメタン菌の一群から、その他の生物と異なった RNase T1 切断パターンが見つかった。これら生物群が生息する環境が太古の地球環境と似ていることから、細菌よりも古い菌という意味で Woese らは「アーキバクテリア」、それ以外の原核細菌を「ユウバクテリア」と呼称することが提案された (Woese and Fox, 1977)。1977 年 11 月 4 日の朝日新聞がこの言葉を古細菌、真正細菌と訳し日本に広めた。その後の研究結果より、古細菌が進化系統学的に真正細菌よりも真核生物に近いことや、他の生物群にない特徴を有していることがわかってきたことから、1990 年、Woese らは生物界が大きく 3 つに分けられることを提唱し、生物界をユーカリア (真核生物)、バクテリア (バクテリア)、アーキア (古細菌) の 3 つのドメインに分けた (Woese et al., 1990)。現生物の共通の祖先について、Iwabe らと Gogarten らは、全生物の分岐以前に機能分化したと推定されるファミリータンパク質を利用して根の位置を決定した (Gogarten et al., 1989; Iwabe et al., 1989)。真核生物、真正細菌、アーキア問わず全ての生物は、DNA を転写し同じ遺伝暗号を用いた翻訳によってできるタンパク質を利用していることから、共通の祖先から進化してきたと考えられている (Ouzounis and Kyrpides, 1996; Weiss et al., 2018)。

アーキアは、核を持たない原核生物でありながら、真正細菌にも真核生物にも類似しない生物学的性質を持っている。中でも、最も顕著な特徴は、その細胞膜脂質の構造にある。アーキアは、真正細菌と真核生物の脂質であるエステル型脂質とは異なり、炭化水素鎖がイソプレノイドアルコールから成るエーテル型の脂質構造をとっている。またアーキアの脂質は、真正細菌と真核生物の脂質とはグリセロール骨格に対して鏡像関係にあり、このことはアーキアの脂質のみに見られる特徴である。グリセロール骨格の立体異性体関係だけは例外なくアーキアとその他の生物を完全に区別している (Koga, 2014; Koga and Morii, 2005)。

アーキアの分類が始まった頃は、アーキアはクレンアーキオタとユリアーキオタの二つのサブドメインに分かれていたが (Woese et al., 1990)、現在では多くのアーキアが単離または環境ゲノム中から発見されてきた結果、タウムアーキオタやアイグアーキオタ、ナノアーキオタ、コルアーキオタなどの新たなサブドメインが発見、提唱されてきた (Brochier-Armanet et al., 2008; Elkins et al., 2008; Huber et al., 2002; Nunoura et al., 2011)。アーキアに属する生物は、強酸性、高温、高塩濃度、高圧下などの極限環境に生息するものが多く、生育環境の厳しさから耐酸性、耐熱性、耐塩性、耐圧性などの性質や、メタン生成機能などの独自の代謝経路

を有している。アーキアが産生している酵素や代謝物は、PCR の耐熱性 DNA ポリメラーゼに代表されるように工業的に有用なものが多いと考えられ、様々な産業的利用が期待されている (reviewed in Dumorné et al., 2017)。

アーキアは先に述べたように、特有の分子生物学的性質を有しているが、DNA 複製機構にも特徴が見られる。全ての生物にとって生命活動を維持するために重要かつ基本的なことには、ゲノム DNA を正確に複製し、遺伝情報を誤りなく次代へ伝達することである。DNA 複製は多くのタンパク質が関与し、現在までに様々なタンパク質因子が同定されているが、関与するタンパク質は異なるものの DNA 複製の主要なメカニズムは真核生物、真正細菌、アーキアの全ての生物ドメインで共通していると考えられている。アーキアのゲノムは環状であることは真正細菌と同じであるが、その DNA 複製タンパク質には真核生物のホモログが多く見つかる (reviewed in Kelman and Kelman, 2014; Yao and O'Donnell, 2016)。

DNA の複製を担う酵素のうち、DNA ポリメラーゼは実際に DNA 鎖を伸長させる酵素である。DNA ポリメラーゼはその配列の相同性から A、B、C、D、E、X、Y の 7 つのファミリーに分類されている。この中で、ファミリー D DNA ポリメラーゼはアーキアのみに見つかる DNA ポリメラーゼであり、真正細菌や真核生物はこのファミリーの DNA ポリメラーゼ遺伝子を有していない (Cann and Ishino, 1999; Ishino and Ishino, 2012; Makarova et al., 2014)。

ファミリー D DNA ポリメラーゼはそれまで知られていた他のファミリーの DNA ポリメラーゼとの配列の相同性がほとんどないため、*Methanocaldococcus jannaschii* の全ゲノム配列がアーキアで初めて解読された当時は、真正細菌や真核生物とは異なり、その配列中からはファミリー B DNA ポリメラーゼ遺伝子が一つしか見つからなかったことが話題となった (Bult et al., 1996)。*M. jannaschii* と同じユリアーキオタに属する超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* は、真核生物型のファミリー B DNA ポリメラーゼを有しているが (Uemori et al., 1993)、1995 年、*P. furiosus* の細胞抽出液の陰イオン交換カラムクロマトグラフィー画分より、ポリメラーゼ活性を示す画分から、ファミリー B DNA ポリメラーゼとは異なる阻害物質の感受性を示すポリメラーゼ活性が発見された (Imamura et al., 1995)。その後、この新規のポリメラーゼは大小二つのサブユニットから構成されるポリメラーゼであり、高いヌクレオチド取込み活性と 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性による校正機能を有していることがわかり、アーキアの DNA 複製に関与していると考えられた (Uemori et al., 1997)。*P. furiosus* だけではなく、*M. jannaschii* のゲノム中にもこの DNA ポリメラーゼと配列の相同性が高いタンパク質が保存されており、その活性や阻害剤感受性も同様であった (Ishino et al., 1998)。また、これらの生物種以外のユリアーキオタのゲノム中にもこのポリメラーゼの配列が保存されており (Cann et al., 1998)、他のファミリーのポリメラーゼとアミノ酸配列に相同性がないことから新規にファミリー D が提唱された (Cann and Ishino, 1999; Cann et al., 1998; Ishino and Ishino, 2001; Mäkinen et al., 1999)。

ファミリーD DNA ポリメラーゼはアーキアの DNA 複製機構の解明のためにも欠くことのできない酵素である。真核生物の DNA 複製では、酵母での研究結果から、Pol ϵ がリーディング鎖を、Pol δ がラギング鎖を合成していると予想されてきた (Morrison et al., 1990)。実際に酵母における遺伝学的な研究結果 (Morrison and Sugino, 1994; Shcherbakova and Pavlov, 1996) および、リボヌクレオチドを取込みやすい変異型 Pol ϵ および Pol δ を持つ酵母での研究結果 (McElhinny et al., 2010; Miyabe et al., 2011) から、Pol ϵ がリーディング鎖を、Pol δ がラギング鎖を合成していると考えられている。アーキアのサブドメインであるユリアーキオタにおいて、ファミリーB およびファミリーD DNA ポリメラーゼが発見された当初は、両者ともに高い DNA ポリメラーゼ活性および 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性 (校正活性) を有していることから、ユリアーキオタの DNA 複製に関与していると考えられてきており、ファミリーD DNA ポリメラーゼが RNA プライマーから DNA 合成を開始できることなどの生化学的性質から、ファミリーB DNA ポリメラーゼがリーディング鎖を、ファミリーD DNA ポリメラーゼがラギング鎖を合成していると考えられてきた (Henneke et al., 2005; Ishino and Ishino, 2006; Uemori et al., 1997)。ユリアーキオタに属する好塩性アーキア *Halobacterium* sp. NRC-1 における遺伝学的な研究で、*polB* 遺伝子および *polD* 遺伝子欠損株が取得できなかったことからこのモデルは支持されてきた (Berquist et al., 2007)。DNA 複製におけるファミリーB およびファミリーD DNA ポリメラーゼの具体的な役割の分担について、*Pyrococcus abyssi* における研究から、リーディング鎖合成では、プライマーゼが合成した RNA プライマーからファミリーD DNA ポリメラーゼが新生鎖の合成を開始し、ある程度の伸長した後、ファミリーB DNA ポリメラーゼがファミリーD DNA ポリメラーゼと置き換わり新生鎖の合成反応を進行させるモデルが提唱された (Rouillon et al., 2007)。また、ラギング鎖合成では二通りの経路が提唱された。(1) RNA プライマーからファミリーD DNA ポリメラーゼが DNA を伸長させた後、下流の岡崎フラグメントを鎖置換活性で鋳型鎖から解離させ、その後 FEN-1 が RNA プライマーを除去しリガーゼによってニックを埋める経路。(2) RNase HII によって下流岡崎フラグメント RNA プライマーが除去された後、ファミリーD (またはファミリーB) DNA ポリメラーゼがラギング鎖を伸長し、鎖置換活性によってはがされた DNA 鎖を FEN-1 が切断し、リガーゼがニックを埋めるという経路である (Henneke, 2012)。しかし、2013 年、二種のユリアーキオタ、*Methanococcus maripaludis* および *T. kodakarensis* の遺伝学的な解析から、*polB* 遺伝子欠損株は得られたが、*polD* 遺伝子欠損株は取得できないという報告が相次いだ (Cubonová et al., 2013; Sarmiento et al., 2013)。このことより、少なくともこの二種においてはファミリーB DNA ポリメラーゼは必須ではなく、ファミリーD DNA ポリメラーゼがアーキアの DNA 複製において必須の酵素であることがわかった。ユリアーキオタでは、ファミリーD DNA ポリメラーゼがアーキアの DNA 複製においてリーディング鎖とラギング鎖の両方の合成を行っている可能性が高まり、改めてファミリーD DNA ポリメラーゼが大きく注目されるようになった。

ユリアーキオタの DNA 複製において、ファミリーD DNA ポリメラーゼがリーディング鎖とラギング鎖の合成を進行しているというモデルで決着がついたかのように見えたが、岡崎フラグメントの成熟について *Thermococcus* sp. 9^oN の研究から次のモデルが提唱された。*Thermococcus* sp. 9^oN のファミリーD DNA ポリメラーゼが RNA プライマーからラギング鎖を伸長させながら進行し、下流の岡崎フラグメント近づく、鎖置換活性が低いために下流の RNA プライマーを解離させることができず、衝突する数ヌクレオチド前で停止する。そして、ファミリーB DNA ポリメラーゼと入れ替わり、その後、ファミリーB DNA ポリメラーゼが下流の岡崎フラグメントを鎖置換活性で鋳型鎖から解離させ、FEN-1 による除去、リガーゼによるニックの修復を行うというモデルである (Greenough et al., 2015)。このモデルでは鎖置換活性の低いファミリーD DNA ポリメラーゼを持つ種では、ファミリーD DNA ポリメラーゼだけでは岡崎フラグメントの成熟を行うことができないために、ファミリーB DNA ポリメラーゼのように鎖置換を行うポリメラーゼが必須であると予想している。遺伝学的な研究結果から必須ではないと考えられてきたファミリーB DNA ポリメラーゼが岡崎フラグメントの成熟に必須であると示され、アーキアの DNA 複製ポリメラーゼの役割については再び混沌としてきた。2017 年、同じ *Thermococcus* 属である *T. kodakarensis* の遺伝子破壊の研究結果から、別のモデルが提案された (Burkhart et al., 2017)。*T. kodakarensis* において、岡崎フラグメントの成熟に関わると考えられている RNase HII、FEN-1 およびアーキアの複製ヘリカーゼ複合体構成タンパク質である GAN (GINS-associated nuclease) について、それぞれ単独での遺伝子欠損株および RNase HII と FEN-1 の二重欠損株は得られたが、RNase HII と GAN の二重欠損株および RNase HII、FEN-1、GAN 三重欠損株は得られなかった。この知見から、ファミリーB DNA ポリメラーゼが鎖置換活性で RNA プライマーを解離させなくても、RNase HII または GAN が RNA プライマーを除去するという新たなモデルが提唱された (Burkhart et al., 2017)。このモデルではファミリーD DNA ポリメラーゼの鎖置換活性が低い種でも、ファミリーD DNA ポリメラーゼがリーディング鎖とラギング鎖両方の伸長を行い、RNase HII、GAN によって岡崎フラグメントの成熟が行われるため、ファミリーB DNA ポリメラーゼが必須ではないことを説明できている (Burkhart et al., 2017)。ただし、これは遺伝学的な研究結果からのモデルであるため、今後、試験管内再構成系でのデータの蓄積による検証が待たれる。

ファミリーD DNA ポリメラーゼはアーキアの細胞内において MCM や GINS などの複製タンパク質や PCNA と相互作用することが報告されている (Kuba et al., 2012; Li et al., 2010, 2011, 2013; Motz et al., 2002; Tori et al., 2007) ことから、ファミリーD DNA ポリメラーゼがアーキアの複製ポリメラーゼであることを支持している。アーキアは真核生物と同様に、スライディングクランプとクランプローダーとして PCNA と RFC を用いていることがわかっている (Cann et al., 1999, 2001)。アーキア由来ファミリーB とファミリーD DNA ポリメラーゼは PCNA と相互作用し、PCNA によってその活性が促進される (Kuba et al., 2012; Rouillon et al., 2007; Tori et al., 2007)。PCNA と相互作用するタンパク質は保存されたアミノ酸配列である PIP

box (PCNA-interacting protein box) を有しており、これを介して相互作用をしている (Warbrick, 1998; Warbrick et al., 1997)。 *P. furiosus* 由来ファミリーD DNA ポリメラーゼにおいて、PIP box と考えられる配列は大サブユニットの C 末端側に見つかり、その配列を欠失させると PCNA による活性の促進が見られなくなる (Tori et al., 2007)。 *P. abyssi* では、大サブユニットの C 末端側に *P. furiosus* と同様の PIP box モチーフがあるほか、N 末端側にも回文配列から成る PIP 様モチーフがあり、PCNA による活性の促進を受けることが報告されている (Castrec et al., 2009)。

DNA ポリメラーゼの分子進化を考えるうえで、ファミリーD DNA ポリメラーゼの存在は非常に興味深い。アーキアは、ファミリーD の他に、B、E、Y に属する DNA ポリメラーゼの遺伝子を有している (Ishino and Ishino, 2012)。ユリアーキオタでは複製ポリメラーゼとして機能していると考えられているのはファミリーD に属する DNA ポリメラーゼであるが、ファミリーD DNA ポリメラーゼを持たないクレンアーキオタではファミリーB DNA ポリメラーゼが複製ポリメラーゼとして機能している (Bauer et al., 2012)。近年、多くの生物の遺伝子配列が同定されており、その配列の解析の結果から様々な知見が得られている。アーキアのファミリーB DNA ポリメラーゼは PolB1、PolB2、PolB3 の三種に分類される (Rogozin et al., 2008) が、これらのファミリーB はアーキア共通の祖先から進化してきたものであると考えられている (Edgell et al., 1998)。PolB3 はタウムアーキオタを除くすべてのアーキアに保存されており、クレンアーキオタではラギング鎖の複製を担っていると考えられている (Bauer et al., 2012) が、ユリアーキオタでは必須ではないことがわかっている (Cubonová et al., 2013; Sarmiento et al., 2013)。PolB1 はユリアーキオタ以外のアーキアに保存されており (Guy and Ettema, 2011; Martijn and Ettema, 2013)、PolB2 は不活性のポリメラーゼであり機能は未知である (Rogozin et al., 2008)。ファミリーD DNA ポリメラーゼはクレンアーキオタ以外で広く保存されている (Cann et al., 1998)。アーキアと真核生物の共通の祖先細胞において、これらアーキアの DNA ポリメラーゼがどのように真核生物の DNA ポリメラーゼに受け継がれてきたのか。詳細な配列の解析により興味深い仮説が提唱されている (図 0-1)。真核生物はファミリーB DNA ポリメラーゼとして Pol α 、Pol δ 、Pol ϵ 、Pol ζ を有しているが、これらがどのようにして進化してきたのかを祖先のアーキア細胞から予想している。アミノ酸配列の詳細な比較から、Pol α 、Pol δ 、Pol ζ はアーキアの PolB3 から進化してきた。また、Pol ϵ は PolB1 から進化してきており、さらに C 末端側に不活性型の PolB2 が融合した形をしている。また、ファミリーD DNA ポリメラーゼの小サブユニットが真核生物のファミリーB DNA ポリメラーゼの B サブユニットへと進化したとされている。大サブユニットは他のどのポリメラーゼとも相同性を示していないが C 末端にあるジンクフィンガーが Pol ϵ に受け継がれ、それから Pol α 、Pol δ 、Pol ζ へも転移した (Makarova et al., 2014; Tahirov et al., 2009)。

以上のように、ファミリーD DNA ポリメラーゼは、アーキアの DNA 複製および DNA ポリメラーゼの分子進化を理解する上で非常に重要な酵素である。この酵素の性質を正確に同定することは、アーキアの DNA 複製機構を解明するために必須である。しかし、ファミリーD DNA ポリメラーゼの研究を進める上で一つの大きな障害に、タンパク質の精製方法と安定性が挙げられる。これまでの研究では、高純度に大量のファミリーD DNA ポリメラーゼを得ることは難しく、精製の過程で多くの分解物が生じ、かつ産生量も少ないことから高純度な精製タンパク質を大量に得ることが難しかった (Jokela et al., 2005; Shen et al., 2004a; Uemori et al., 1997)。そのため、他のファミリーの DNA ポリメラーゼとは異なり、各サブユニットの一部分の構造のみが報告されているだけで (Matsui et al., 2011, 2013; Yamasaki et al., 2010)、複合体を形成した全体の立体構造はいまだ解明されておらず、どのような機構で酵素活性を発揮しているかは不明のままである。

ファミリーD DNA ポリメラーゼの酵素反応のメカニズムやアーキアの DNA 複製機構の解明のためには高純度なタンパク質を得る必要がある。そのため、筆者は高純度なファミリーD DNA ポリメラーゼを得るために、タンパク質の産生方法や精製方法を検討、改良し、高純度かつ大量のファミリーD DNA ポリメラーゼを得る手法を開発した。本論の第一章ではファミリーD DNA ポリメラーゼの産生方法と精製方法の検討を行った結果を論ずる。第二章では高純度に精製したファミリーD DNA ポリメラーゼを用いて、ファミリーD DNA ポリメラーゼの生化学的性質の同定を試みた。本研究結果により、ファミリーD DNA ポリメラーゼの基本的な生化学的性状が明確になり、アーキアの DNA 複製についての理解を深めるための大きな知識を提供するものであると考えている。

本論

第一章 ファミリーD DNA ポリメラーゼの精製方法の確立

1.1. 序論

DNA ポリメラーゼについての研究は、大腸菌の DNA ポリメラーゼ I の発見を黎明として、様々な生物由来の DNA ポリメラーゼが発見、単離されてきた。特に、好熱菌由来の DNA ポリメラーゼは、*Thermus aquaticus* 由来の DNA ポリメラーゼ I (Taq ポリメラーゼ) に代表されるように、PCR などへの利用が期待できるため、様々な種から多くの DNA ポリメラーゼが単離され、その性質が研究されてきた (Gueguen et al., 2001; Takagi et al., 1997; Uemori et al., 1993, 1995)。

現在までにファミリーD DNA ポリメラーゼの性状は様々な種類のアーキアで調べられており、生化学的な性状は *P. furiosus* (Ishino and Ishino, 2001; Uemori et al., 1997)、*M. jannaschii* (Ishino et al., 1998; Jokela et al., 2004)、*Pyrococcus horikoshii* (Matsui et al., 2013; Shen et al., 2001, 2003; Tang et al., 2004)、*P. abyssi* (Castrec et al., 2010; Gueguen et al., 2001; Henneke et al., 2005)、*T. kodakarensis* (Kuba et al., 2012)、*Thermococcus* sp. 9°N (Greenough et al., 2014, 2015; Schermerhorn and Gardner, 2015)、*Archaeoglobus fulgidus* (Abellón-Ruiz et al., 2016) などのアーキアにおいて盛んに研究が行われてきた。

ファミリーD DNA ポリメラーゼのドメイン構造について模式図で表した (図 1-1)。ファミリーD DNA ポリメラーゼは、小サブユニットと大サブユニットの二つのサブユニットが複合体を形成してポリメラーゼとして機能している (Uemori et al., 1997)。小サブユニットは真核生物のファミリーB DNA ポリメラーゼである Pol α 、Pol δ 、Pol ϵ の B サブユニットと相同性を有しており、OB-fold ドメインや C 末端側にホスホジエステラーゼドメインを有している (Aravind and Koonin, 1998; Yamasaki et al., 2010)。ホスホジエステラーゼドメインには Mre11 様のエキソヌクレアーゼモチーフが保存されており (Gueguen et al., 2001)、これらのモチーフのうち活性に関与していると考えられるアミノ酸を置換した変異体は 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を失うことが報告されている (Greenough et al., 2014; Shen et al., 2004a)。

大サブユニットは小サブユニットとは異なり他の既知の DNA ポリメラーゼとも配列の相同性はないが、既知のポリメラーゼモチーフ A と C がその配列中に見つかっており (Cann et al., 1998)、このモチーフとは別に *P. horikoshii* の変異体の研究からポリメラーゼ活性に必要な残基が特定されている (Shen et al., 2001)。C 末端側にジンクフィンガーモチーフがあり (Cann and Ishino, 1999)、このモチーフを欠失させた変異体は、ポリメラーゼ活性は維持されたまま 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を欠失することが報告されている (Shen et al., 2003, 2004b)。

DNA ポリメラーゼの立体構造は精力的に解明されており、現在までに多くの立体構造が報告されている (Hashimoto et al., 2001; Hikida et al., 2017; Kim et al., 2008, 1995; Wynne et al., 2013) が、その中でファミリーD は唯一全体の立体構造が解明されていないファミリーのポリメラーゼであり、*P. horikoshii* において、小サブユニットの N 末端側の部分構造 (PhoDP1(1-72)) と大サブユニットの N 末端側の部分的な立体構造 (PhoDP2(48-291)) が報告されているのみであった (Matsui et al., 2011; Yamasaki et al., 2010)。サブユニット同士の相互作用部位については、*P. horikoshii* において精力的に研究が進められてきた (Shen et al., 2003; Tang et al., 2004)。ヒスチジンタグによる共沈殿法により、PhoDP1 の 201 番目から 206 番目、および 599 番目から 622 番目と全長の PhoDP2 が、全長の PhoDP1 と PhoDP2 の 1255 番目から 1332 番目が相互作用していることが報告されている。また、PhoDP2 の 1 番目から 300 番目まで産生させた部分タンパク質がゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分析結果から二量体または三量体構造であることが報告されている (Shen et al., 2003)。さらに酵母ツーハイブリッド法から、全長の PhoDP1 と PhoDP2 の 1293 番目から 1304 番目、PhoDP1 の 201 番目から 622 番目と PhoDP2 の 1 番目から 300 番目、PhoDP1 の 1 番目から 200 番目と PhoDP2 の 792 番目から 1163 番目が相互作用しており、SPR 法からチップに固定した PhoDP2 の 792 番目から 1163 番目と全長の PhoDP1、チップに固定した全長 PhoDP1 と PhoDP2 の 1290 番目から 1310 番目が相互作用していることが報告され、断片的な情報ではあるがサブユニット同士の相互作用について明らかになってきている (Tang et al., 2004)。

ファミリーD DNA ポリメラーゼは、その精製方法とタンパク質の安定性に大きな問題がある。従来の研究では、大腸菌発現系において各サブユニット単独で産生、またはファミリーD DNA ポリメラーゼとして共産生させた場合、分解物が多く生じること、かつ産生量も少ないことから高純度な精製タンパク質を大量に得ることが難しかった (Jokela et al., 2005; Uemori et al., 1997)。大量の高純度なタンパク質の精製方法の確立は、結晶化などによるタンパク質の立体構造の解析のため、また生化学的性状を同定するためにも非常に重要な要素である。

著者はアーキアの DNA 複製を理解する上でファミリーD DNA ポリメラーゼの性質や構造を正確に調べる必要があると考え、まずはこのタンパク質を高純度にするための精製系の確立を目的に研究を進めた。

本研究対象としては、*T. kodakarensis* 由来ファミリーD DNA ポリメラーゼを選んだ。*T. kodakarensis* はユリアーキオタに属する超好熱性のアーキアであり (Atomi et al., 2004; Morikawa et al., 1994)、本菌のファミリーB DNA ポリメラーゼは PCR 用の酵素である KOD ポリメラーゼとして用いられている (Takagi et al., 1997)。また、遺伝子操作系が確立した菌株であり (Sato et al., 2005)、広く研究されていることから超好熱性アーキアのモデル生物として用いられている。

著者は、*T. kodakarensis* 由来ファミリーD DNA ポリメラーゼについて、TkoDP1 および TkoDP2 サブユニット単独および共産生させた TkoPolD 複合体を高純度に精製するタンパク質産生系および精製方法を確立した。高純度なタンパク質を得られることによって、ファミリーD DNA ポリメラーゼ全体の立体構造の解明につながることを期待できる。また、各サブユニット単独および複合体の生化学的性状を同定することができるため、高純度なファミリーD DNA ポリメラーゼの調製方法の確立はアーキアの DNA 複製機構の解明に大きく貢献するものであると考えている。

1.2. 材料と方法

1.2.1. 培地および溶液組成一覧

大腸菌の培養には LB 培地に適切な抗生物質を添加したものを用いた。使用した抗生物質の濃度を次に記す。

アンピシリン	50 µg/ml
カナマイシン	50 µg/ml
クロラムフェニコール	37 µg/ml
ストレプトマイシン	50 µg/ml

昆虫細胞 Sf9 の培養に用いた Sf-900™ II SFM 培地 (Gibco™, Thermo Fisher Scientific 社) には次に記す濃度の抗生物質および FBS を添加したものを使用した。

ペニシリン	50 unit/ml
アンホテリシン B	125 ng/ml
ゲンタマイシン	5 µg/ml
ストレプトマイシン	50 µg/ml
FBS	0.25% (v/v)

タンパク質の精製に用いた溶液組成を示す。

溶液 A	50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0
溶液 B	50 mM sodium phosphate buffer, 0.3 M NaCl, pH 7.0
溶液 C	20 mM sodium phosphate buffer, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0
溶液 D	10 mM potassium phosphate, 0.05 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT, 10% glycerol, pH 6.8
溶液 E	1 M potassium phosphate, 0.05 mM CaCl ₂ , 1 mM DTT, 10% glycerol, pH 6.8

1.2.2. 各タンパク質産生用コンストラクトの作製

TkoDP1

大腸菌を宿主としたタンパク質産生系

野生型 TkoDP1

本研究で用いた TkoDP1 発現用のプラスミド pET24a-TkoDP1 は、2009 年度修士課程修了の瀧石によって構築された (瀧石, 2010)。

N 末端 HAT タグ付加 TkoDP1 (N-HAT-tagged TkoDP1)

本プラスミドは山上健助教によって作製された。pHAT10 (タカラバイオ社) のマルチクローニングサイトを改変し、NdeI と NotI の制限酵素サイトを追加した改変 pHAT10 を作製し、pET24a-TkoDP1 を制限酵素 NdeI および NotI で消化した産物を、同じ制限酵素で切断した改変 pHAT10 にクローニングすることで、pHAT-TkoDP1 を作製した。

C 末端ヒスチジントグ付加 TkoDP1 (C-His-tagged TkoDP1)

本プラスミドは山上健助教によって作製された。先述した pET24a-TkoDP1 を鋳型に、5'側に制限酵素 NdeI 認識配列を、3'側に終止コドンを除いて NotI 認識配列が付加されるように設計したプライマー、TK1902F: 5'-GCGCCCATATG CTGGTGGAGG ACCTCCTTAA GA-3'と TK1902CR: 5'-GGGGCGGCGCCG CAACCCCTC GCAAACTGG TCA-3'で増幅し、制限酵素 NdeI および NotI で消化した産物を、同じ制限酵素で切断した pET24a にクローニングし、pET24a-TkoDP1CH を作製した (配列中の下線は制限酵素認識配列)。

変異体 TkoDP1 (D473A H475A)

エキソヌクレアーゼ活性を不活性化した変異体TkoPolDを調製するために、エキソヌクレアーゼモチーフに点変異を導入したTkoDP1(D473A H475A) 産生用のプラスミドを構築した。pET24a-TkoDP1を鋳型に、site direct mutagenesis法によって変異を導入することでpET24a-TkoDP1(D473A H475A) を調製した。使用したプライマーの配列は、ExoF: 5'-GCCATCCTGC TCAGCgcaAT CgcaGTCGGT AGCAACAAG-3'およびExoR: 5'-CTTGTGCTACCGACTgcGA TtgcGCTGAG CAGGATGGC-3' である (配列中の小文字は変異導入箇所)。

昆虫細胞でのタンパク質産生系

Sf9 昆虫細胞の復帰培養および継代培養

Sf9 昆虫細胞の培養は 27°C、湿潤環境下で行い、培地には Sf-900™ II SFM 培地を使用した。凍結保存していた Sf9 昆虫細胞を 25–30 ml の培地に懸濁することで、細胞を洗浄した。その後、10 ml の培地に懸濁し、100 mm 培養ディッシュに播種し、72 時間復帰培養を行った。72 時間後、培地を交換し、再度 72 時間培養を行った。

復帰培養後の細胞は、ピペッティングでディッシュから遊離させた後、10 ml の新しい培地に懸濁し、30 ml スピナーフラスコで 72 時間浮遊培養を行った。培養後血球計算板で細胞数

を計測し、細胞数が 5×10^5 個/ml となるように 10 ml の培地に懸濁し、再度 30 ml スピナーフラスコで 72 時間浮遊培養を行った。以上の操作を繰り返し、生存率が 90%以上の Sf9 昆虫細胞の浮遊培養系を調製した。以後の操作では、細胞密度が $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ 個/ml の範囲に収まるよう、適宜継代培養を行った。また、必要に応じて培養のスケールを 30 ml、50 ml、100 ml、300 ml と変更した。

野生型 TkoDP1 産生用組換えバキュロウイルスの作製

組換えバキュロウイルスは、Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System (Invitrogen 社) を用いて、ユーザーマニュアル通りに作製した。前項で記述した pET24a-TkoDP1 から TkoDP1 遺伝子を pFastBac[™]1 (Invitrogen 社) に乗せ換え、*Escherichia coli* DH10Bac[™] を pFastBac[™]1-TkoDP1 で形質転換させた。pFastBac[™]1 プラスミドは山上健助教によって、マルチクロニングサイトの上流側に制限酵素 NdeI で切断できるよう改変されているものを用いた。DH10Bac[™] 細胞内で目的遺伝子が Bacmid に乗せ換えられたことを青白コロニーで判定した。組換え Bacmid を PureLink[™] Miniprep Kit (Invitrogen 社) を用いて精製した。六穴 (35 mm プレート) の培養ディッシュに 2 ml の Grace's Insect Medium, unsupplemented 培地 (Gibco[™], Thermo Fisher Scientific 社) と 8×10^5 個の Sf9 昆虫細胞を播種した。P0 の組換えバキュロウイルスは Grace's Insect Medium, unsupplemented 培地に濃度が 4% (v/v) になるよう Cellfectin[®] II Reagent (Invitrogen 社) と、組換え Bacmid (終濃度 40 ng/μl) を添加し、ボルテックスで攪拌後、室温で 30 分間静置しリポソームを形成させることで調製した。P0 の組換えバキュロウイルスを播種した後、27°C で 5 時間インキュベートした。その後培地を Grace's Insect Medium, supplemented 培地 (Gibco[™], Thermo Fisher Scientific 社) に FBS を終濃度 10%になるように添加したものと交換し、27°C で 72 時間培養した。培養上清を回収し、それを P1 の組換えバキュロウイルス-TkoDP1 とし、4°C で保存した。

組換えバキュロウイルスの増幅

組換えバキュロウイルスの増幅は次のように行った。Sf9 昆虫細胞を 10 ml の Sf-900[™] II SFM 培地に 5×10^5 個/ml の細胞密度になるように懸濁し、細胞懸濁液を 100 mm 培養ディッシュに播種し、室温で 20 分間静置することで細胞を接着させた後、P1 ウイルス液を 0.1 ml 添加した。27°C で 72 時間、静置培養をした後、培養上清を回収し P2 の組換えバキュロウイルス液とし、4°C で保存した。さらに、Sf9 昆虫細胞を 100 ml の Sf-900[™] II SFM 培地に 5×10^5 個/ml の細胞密度になるように懸濁し、細胞懸濁液を 300 ml スピナーフラスコに入れ、P2 ウイルス液を 1 ml 添加した。27°C で 72 時間、浮遊培養をした後、培養上清を回収し P3 の組換えバキュロウイルス液とし、4°C で保存した。

組換えバキュロウイルスの力価測定

組換えバキュロウイルスの力価の測定は、一般的なブラークアッセイおよび BacPAK™ qPCR Titration Kit (Clontech 社) を使用した。ブラークアッセイは Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System のユーザーマニュアルに従って行い、qPCR を利用した力価測定は、BacPAK™ qPCR Titration Kit のユーザーマニュアルに従って行った。

TkoDP2

野生型 TkoDP2

本研究で用いた TkoDP2 発現用のプラスミド pET21a-TkoDP2 は、2009 年度修士課程修了の瀧石によって構築された (瀧石, 2010)。

N 末端 HAT タグ付加 TkoDP2 (N-HAT-tagged TkoDP2)

本プラスミドは山上健助教によって作製された。pHAT10 のマルチクローニングサイトを改変し、NdeI と NotI の制限酵素サイトを追加した改変 pHAT10 を作製した。pET21a-TkoDP2 を制限酵素 NdeI および NotI 消化した産物を、同じ制限酵素で切断した改変 pHAT10 にクローニングし、pHAT-TkoDP2 を作製した。

C 末端ヒスチジンタグ付加 TkoDP2 (C-His-tagged TkoDP2)

本プラスミドは山上健助教によって作製された。pET21a-TkoDP2 を鋳型に 5'側に制限酵素 NdeI 認識配列を、3'側に終止コドンを除いて NotI 認識配列が付加されるように設計したプライマー、TK1903F1: 5'-GCGCCCATATG AGCGAGGAGA TTTACTCGCC TG-3' と TK1903R1: 5'-GGGGCGGCCG CTTACGAGCC GAAGAACTCG TCGAGG -3' で増幅し、制限酵素 NdeI および NotI で消化した産物を、同じ制限酵素で切断した pET21a にクローニングし、pET21a-TkoDP2CH を作製した (配列中の下線は制限酵素認識配列)。

1.2.3. 各タンパク質の産生方法

TkoDP1 の産生方法

大腸菌を用いた産生

E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Agilent Technologies 社) を各 TkoDP1 産生プラスミドで形質転換した。カナマイシンとクロラムフェニコールを加えた 1 L の LB 培地を 5 L の羽付きフ

ラスコに入れ、37°C で振とう培養を行った。菌の増殖の指標である濁度 OD₆₀₀ が 0.2–0.3 の範囲になった時に一旦培養を止め、培養液の温度を 25°C に下げた。その後、IPTG を終濃度が 1 mM になるように添加し、25°C で振とう培養を 17 時間行った後、菌体を回収した。

昆虫細胞を用いた産生

Sf9 昆虫細胞を細胞密度が 5×10^5 個/ml になるように Sf-900™ II SFM 培地に加え、300 ml の細胞懸濁液を調製した。調製した細胞懸濁液を 1 L のスピナーフラスコに入れ、P3 の組換えバキュロウイルス液を MOI が 0.1 となるように添加した。27°C で浮遊培養を行い、72 時間後に Sf9 昆虫細胞を回収した。

TkoDP2 の産生方法

E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を各 TkoDP2 産生プラスミドで形質転換した。アンピシリンとクロラムフェニコールを加えた 1 L の LB 培地を 5 L の羽付きフラスコに入れ、37°C で振とう培養を行った。菌の増殖の指標である濁度 OD₆₀₀ が 0.2–0.3 の範囲になった時に一旦培養を止め、培養液の温度を 25°C に下げた。その後、IPTG を終濃度が 1 mM になるように添加し、25°C で振とう培養を 17 時間行ったあと菌体を回収した。

TkoPolD および変異体 TkoPolD の産生方法

大腸菌体内で TkoDP1 と TkoDP2 を共産生させたものを TkoPolD、TkoDP1(D473A H475A) と TkoDP2 を共産生させたものを変異体 TkoPolD とする。

E. coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を pET21a-TkoDP2 で形質転換し、アンピシリンとクロラムフェニコールを加えた LB プレート上で 37°C で一晩培養した。LB プレート上のコロニーを複数個取り、アンピシリンとクロラムフェニコールを添加した LB 培地に植菌した。OD₆₀₀ が 0.2–0.3 の時に菌体を回収し、コンピテントセル化させ、pET24a-TkoDP1 または pET24a-TkoDP1(D473A H475A) で形質転換させた。形質転換した大腸菌をアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールを添加した 1 L の LB 培地に植菌し、5 L の羽付きフラスコに入れ、37°C で振とう培養を行った。菌の増殖の指標である濁度 OD₆₀₀ が 0.2–0.3 の範囲になった時に一旦培養を止め、培養液の温度を 25°C に下げた。その後、IPTG を終濃度が 1 mM になるように添加しタンパク質の産生を誘導した。25°C で 17 時間振とう培養を行い、菌体を回収した。

シャペロンタンパク質との共産生

シャペロンとの共産生は次のように行った。山上健助教により pGro7 (タカラバイオ社) の抗生物質耐性遺伝子をクロラムフェニコールからストレプトマイシンに改変したものをを用いて、*E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を形質転換させ、ストレプトマイシンとクロラムフェニコールを加えた LB プレート上で 37°C で一晩培養した。LB プレート上のコロニーを複数個取り、ストレプトマイシンとクロラムフェニコールを添加した LB 培地に植菌した。OD₆₀₀ が 0.2–0.3 程度の時に菌体を回収し、コンピテントセル化させ、それぞれのタンパク質産生用のプラスミドで形質転換させた。形質転換した大腸菌を、アンピシリンとストレプトマイシン、クロラムフェニコール、シャペロンの誘導のための L-アラビノース (0.5 mg/ml) を加えた 1 L の LB 培地に植菌した。以降の操作は各タンパク質の産生方法と同様に行った。

1.2.4. 各タンパク質の精製

TkoDP1

野生型 TkoDP1 の精製

TkoDP1 を産生した 1 L 培養液分の昆虫細胞および大腸菌を、1 タブレットの Complete (Roche 社) を添加した 20 ml の 0.6M 塩化ナトリウムを含む溶液 A に懸濁した。超音波によって細胞を破碎後、遠心分離 (24,000 × g, 4°C, 10 分) を行い、上清を回収した。上清を 0.6 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A を加えて 70 ml とし、熱処理 (70°C, 20 分) を行い、細胞由来のタンパク質の大部分を熱変性させ、遠心分離 (24,000 × g, 4°C, 10 分) の後上清を回収することによって取り除いた。熱処理後の上清に対して、濃度が 1 M になるように塩化ナトリウムを添加し、終濃度が 0.15% (w/v) になるように 5% ポリエチレンイミン溶液を添加し、氷上で 30 分間静置することで DNA を沈殿させた。遠心分離 (24,000 × g, 4°C, 10 分) 後の上清に対して 70%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え 4°C で一晩静置しタンパク質を沈殿させた。

沈殿を遠心分離 (24,000 × g, 4°C, 10 分) で回収した後、50 ml の 1 M 硫酸アンモニウムを含む溶液 A に溶かし、疎水性カラムクロマトグラフィーで分画した。カラムは HiTrap Phenyl HP 1 ml カラム (GE Healthcare 社) を用い、流速 1 ml/min で硫酸アンモニウム濃度を 1 M から 0 M へ 15 ml を用いて展開した。TkoDP1 の溶出画分を回収し、脱塩カラムである HiPrep Desulting 26/10 カラム (GE Healthcare 社) を用いて 0.1 M NaCl を含む溶液 A へ溶液を交換した。次に、陰イオン交換カラムの HiTrap Q HP 1 ml カラム (GE Healthcare 社) に供し、流速 0.5 ml/min で、塩化ナトリウム濃度を 0.1 M から 1 M まで 10 ml を用いて展開した。HiTrap Q HP 1 ml カラムで溶出された画分のうち、夾雑物の少ない TkoDP1 を含む画分を精製 TkoDP1 とした。精製した TkoDP1 は、液体窒素で急速に凍結させた後、-80°C で保存した。

N-HAT-tagged TkoDP1 の精製

N-HAT-tagged TkoDP1 を産生させた 200 ml 培養液分の大腸菌のペレットに対し、1 タブレットの Complete を添加した 10 ml の溶液 B に懸濁した。超音波によって細胞を破碎後、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) を行い、上清を HisTrap FF 5 ml カラム (GE Healthcare 社) に供し、流速 5 ml/min で溶液 B を波長 280 nm の吸光度が基底に下がるまで約 75 ml 流した。その後、イミダゾール濃度を 0 mM から 100 mM まで 125 ml を用いて展開。非結合画分および結合画分を回収した。

C-His-tagged TkoDP1 の精製

C-His-tagged TkoDP1 を産生させた 100 ml 培養液分の大腸菌のペレットに対し、1 タブレットの Complete を添加した 25 ml の 0.5 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A に懸濁した。超音波によって細胞を破碎後、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) を行い、上清を回収した。上清を熱処理 (80°C , 20 分) した後、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) を行い、変性したタンパク質を除去した。熱処理後の上清に対して、終濃度が 0.15% (w/v) になるように 5% ポリエチレンイミン溶液を添加し、氷上で 30 分間静置することで DNA を沈殿させた。遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) 後の上清に対して 70% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え 4°C で一晩静置しタンパク質を沈殿させた。遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) 後、沈殿を溶液 C 10 ml に溶かし、HisTrap HP 1 ml カラム (GE Healthcare 社) を用いて、流速 1 ml/min で溶液 C を波長 280 nm の吸光度が基底に下がるまで約 15 ml 流した。その後、イミダゾール濃度を 20 mM から 500 mM まで 5 ml を用いて展開し、非結合画分および結合画分を回収した。HisTrap HP 1 ml カラムの溶出画分を溶液 A に透析し、透析後のタンパク質溶液を HiTrap Q HP 1 mL カラムで塩化ナトリウムの濃度を 0 M から 1 M まで 10 ml を用いて展開した。続いて、HiTrap Q HP 1 ml カラムのタンパク質溶出画分に対し、終濃度が 1 M となるように硫酸アンモニウムを加え、HiTrap Phenyl HP 1 ml カラムに供し、硫酸アンモニウム濃度を 1 M から 0 M まで 5 ml を用いて展開した。続いて、HiTrap Q HP 1 ml カラムのタンパク質溶出画分を溶液 D に対して透析を行い、溶液を交換した。透析後のタンパク質溶液をハイドロキシアパタイトカラムの Econo-PAC[®] CHT-II cartridge カラム (Bio-Rad Laboratories 社) に供し、溶液 D から溶液 E へ、リン酸カリウム緩衝液の濃度を 10 mM から 1 M まで 10 ml を用いて展開させた。

TkoDP2

野生型 TkoDP2 の精製

TkoDP2 を産生した 4 L 分の大腸菌体を、1 タブレットの Complete 添加した 20 ml の 0.6 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A に懸濁した。超音波によって細胞を破碎した後、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) を行い、上清を回収した。上清に 0.6 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A を加えて 100 ml にした後、熱処理 (70°C , 20 分) を行い、大腸菌由来のタンパク質を熱変性させ、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) をすることによって取り除いた。熱処理後の上清に対して、濃度が 1 M になるように塩化ナトリウムを添加し、終濃度が 0.15% (w/v) になるように 5% ポリエチレンイミン溶液を添加し、氷上で 30 分間静置することで DNA を沈殿させた。遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) 後の上清に対して 70% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え 4°C で一晩静置しタンパク質を沈殿させた。

沈殿を遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) によって回収し、100 ml の 1 M 硫酸アンモニウムを含む溶液 A に溶かし、疎水性カラムクロマトグラフィーで分画した。カラムは HiTrap Butyl HP 5 ml カラム (GE Healthcare 社) を用い、流速 5 ml/min で硫酸アンモニウム濃度を 1 M から 0 M まで 25 ml を用いて展開した。TkoDP2 を含む画分を脱塩カラム HiPrep Desulting 26/10 カラムに供し、0.1 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A で溶出した。その後、アフィニティーカラムである HiTrap Heparin HP 5 ml カラム (GE Healthcare 社) を用いて、流速 5 ml/min で塩化ナトリウム濃度を 0.1 M から 1 M まで 100 ml を用いて展開した。TkoDP2 を含む画分を脱塩カラム HiPrep Desulting 26/10 カラムに供し、0.1 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A で溶出した。次に、陰イオン交換カラムの ENrich™ Q 5/50 カラム (Bio-Rad Laboratories 社) に供し、流速 0.5 ml/min で、塩化ナトリウム濃度を 0.1 M から 0.3 M まで 30 ml を用いて展開した。ENrich™ Q 5/50 カラムで溶出された画分のうち、夾雑物の少ない TkoDP2 を含む画分を精製 TkoDP2 とした。精製した TkoDP2 は、液体窒素で急速に凍結させた後、 -80°C で保存した。

N-HAT-tagged TkoDP2 の精製

N-HAT-tagged TkoDP2 を産生させた 200 ml 培養液分の大腸菌のペレットに対し、1 タブレットの Complete を添加した 10 ml の溶液 B に懸濁した。超音波によって細胞を破碎後、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) を行い、上清を回収し、HisTrap FF 5 ml カラムを用い、流速 5 ml/min で溶液 B を波長 280 nm の吸光度が基底に下がるまで約 75 ml 流した。その後、イミダゾール濃度を 0 mM から 100 mM まで 125 ml を用いて展開した。非結合画分および結合画分を回収した。

C-His-tagged TkoDP2 の精製

C-His-tagged TkoDP2 を産生させた 100 ml 培養液分の大腸菌のペレットに対し、1 タブレットの Complete を添加した 10 ml の 0.5 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A に懸濁した。超音波に

よって細胞を破碎後、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) を行い、上清を回収した。上清を熱処理 (80°C , 20 分) した後、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) 行い、変性したタンパク質を除去した。熱処理後の上清に対して、終濃度が 0.15% (w/v) になるように 5% ポリエチレンイミン溶液を添加し、氷上で 30 分間静置することで DNA を沈殿させた。遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) 後の上清に対して 70% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え 4°C で一晩静置しタンパク質を沈殿させた。遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) 後、沈殿を 10 ml の溶液 C に溶かし、HisTrap HP 1 ml カラムを用いて、流速 1 ml/min で波長 280 nm の吸光度が基底に下がるまで溶液 C を約 15 ml 流した。その後、イミダゾール濃度を 20 mM から 500 mM まで 5 ml を用いて展開し、非結合画分および結合画分を回収した。

TkoPolD

野生型 TkoPolD の精製

TkoPolD を産生した 4 L 分の大腸菌体を、Complete を添加した 20 ml の 0.6 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A に懸濁した。超音波によって細胞を破碎したあと、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) を行い、上清を回収した。上清を 0.6 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A を加えて 100 ml にした後熱処理 (80°C , 20 分) を行い、大腸菌由来のタンパク質を熱変性させ、遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) をすることによって取り除いた。熱処理後の上清に対して、濃度が 1 M になるように塩化ナトリウムを添加し、終濃度が 0.15%になるように 5% ポリエチレンイミン溶液を添加し、氷上で 30 分間静置することで DNA を沈殿させた。遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) 後の上清に対して 70% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え 4°C で一晩静置しタンパク質を沈殿させた。

沈殿を遠心分離 ($24,000 \times g$, 4°C , 10 分) によって回収した後、100 ml の 1 M 硫酸アンモニウムを含む溶液 A で溶かし、疎水性カラムクロマトグラフィーで分画した。試料は HiTrap Butyl HP 5 ml カラムに半分量ずつ二回に分けて供した。疎水性相互作用カラムによる分画は、流速 5 ml/min で硫酸アンモニウムの濃度を 1 M から 0 M まで 100 ml を用いて展開した。TkoPolD を含み、かつ夾雑物が少ない画分を回収し、脱塩カラム HiPrep Desulting 26/10 カラムに供し、0.1 M 塩化ナトリウムを含む溶液 A へ溶液を交換した。その後、アフィニティーカラムである HiTrap Heparin HP 5 ml カラムに供し、流速 5 ml/min で塩化ナトリウムの濃度を 0.1 M から 1 M まで 100 ml を用いて展開した。TkoPolD を含む画分を回収し、塩化ナトリウムの濃度が 0.1 M になるように溶液 A で希釈した後、陰イオン交換カラムである ENrich™ Q 5/50 カラムに供した。流速 0.5 ml/min で、塩化ナトリウムの濃度を 0.1 M から 0.35 M まで 38 ml を用いて展開した。TkoPolD を含む画分を回収し、精製 TkoPolD とした。精製した TkoPolD は、液体窒素で急速に凍結させた後、 -80°C で保存した。

変異体 TkoPolD の精製

変異体 TkoPolD は TkoPolD と同様の方法で精製した。ただし、精製に使用した大腸菌の菌体量は 1 L 分を使用し、使用した菌体量に合わせて溶液量などを適宜調整した。

1.2.5. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性測定

活性測定に用いたタンパク質は次のように調製した。大腸菌を用いて産生させた TkoDP1 または昆虫細胞を用いて産生させた TkoDP1 を、大腸菌を用いて産生させた TkoDP2 と混合し、72°C で 3 分間加熱したものを TkoDP1+DP2 とした。3'-5'エキソヌクレアーゼ活性測定は、5 nM の基質 DNA を含む基本反応溶液 (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA) を 20 µl 調製し、10 nM のタンパク質を加えて反応を開始させた。基質には 5nM の primed DNA を使用した。65°C で 2.5、5、10、20 分間反応を行い、反応溶液の二倍量のホルムアミドを加えて反応を停止させた。反応産物は、8 M の尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて TBE バッファー中で変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動をすることで分析した (8 M urea-15% PAGE)。電気移動後、ゲルをイメージアナライザーTyphoon Trio+ (GE Healthcare 社) で可視化した。

1.3. 結果

1.3.1. TkoDP1(D473A H475A) の変異導入部位の検討

変異を導入するアミノ酸残基の検討は次のように行った。*P. horikoshii* 由来ファミリーD DNA ポリメラーゼの研究において、PhoDP1 の 363 番目のグルタミン酸、または 365 番目のヒスチジンをアラニンに置換した変異体 PhoDP1 D363A と PhoDP1 H365A は、マグネシウムイオンおよびマンガンイオンのどちらの二価金属イオン存在下でも 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が完全に消失した (Shen et al., 2004a)。以上の報告から、TkoDP1 においてこれらのアミノ酸に相当する 473 番目のグルタミン酸と 475 番目のヒスチジンの両アミノ酸残基をアラニンに置換する二重変異体を作製した (図 1-2)。

1.3.2. TkoDP1 の精製

まず初めに、タンパク質産生宿主に大腸菌を選択した。また、高純度な TkoDP1 を精製するために、アフィニティータグを利用した。これは、アフィニティータグによる迅速な精製により、TkoDP1 が大腸菌体内で産生されてから精製までの時間を短縮することによって、産生宿主由来のプロテアーゼによる分解を防ぐことを目的とした。

研究室の先行研究による知見から、N 末端側にヒスチジンタグを付加した TkoDP1 は、金属アフィニティーカラムに結合せず、高純度に精製できないことがわかっていた。高分子量のタンパク質の産生では、6 × ヒスチジンタグのような短いタグだと構造の内部に埋もれる可能性があるため、ヒスチジンタグよりも長い HAT タグを利用するために、pHAT10 ベクターに TkoDP1 遺伝子をクローニングした。pHAT10 ベクターはマルチクローニングサイトの上流に HAT タグをコードしているベクターである。HAT タグは天然に存在するポリヒスチジンペプチドで封入体を形成しにくい特徴を有するほか、ヒスチジンタグよりも長い場合、タンパク質産生時にタグがタンパク質外部に存在する可能性が高くなる(図 1-3 (a))。そこで HAT タグを TkoDP1 の N 末端側に付加した N-HAT-tagged TkoDP1 を産生させ、HisTrap FF 5 ml カラムで分画し、SDS-PAGE によって非結合画分と結合画分に溶出された N-HAT-tagged TkoDP1 の割合をバンドの大きさから推定した (図 1-3 (b))。非結合画分の 24,000 分の 1 (図 1-3 (b) lane 5) に検出された N-HAT-tagged TkoDP1 バンドは、結合画分の 2000 分の 1 (図 1-3 (b) lane 6) のバンドよりも大きかったことより、カラムに結合した N-HAT-tagged TkoDP1 は 10%以下であると見積もった。このことから N-HAT-tagged TkoDP1 は HisTrap カラムに結合しないことがわかった。

そこで、C 末端側に 6 × ヒスチジンタグを付加することで高純度な TkoDP1 を精製することを目指した。また、同時にタンパク質の正しいフォールディングを助けるため、シャペロン

プラスミド pGro7 を導入した。pGro7 は原核生物由来のシャペロニンである *groEL* 遺伝子と *groES* 遺伝子をコードおり、L-アラビノースによって発現が誘導されるプラスミドである。

C-His-tagged TkoDP1 を金属アフィニティーカラムである HisTrap HP 1 ml カラムで精製した (図 1-4)。C-His-tagged TkoDP1 は金属アフィニティーカラムに結合したが、溶出画分には C-His-tagged TkoDP1 の分解物と考えられる夾雑物が混在していた (図 1-4 (b))。夾雑物を除くため、分離原理の異なる複数種のカラムによって分画を試みた (図 1-5)。精製の指標として、TkoDP1 の直下に見える TkoDP1 の分解物と考えられるバンドの分画を目指した。金属アフィニティーカラムの溶出画分を陰イオン交換カラムである HiTrap Q HP 1 ml カラムに供し、夾雑物の分画を試みた (図 1-5 (a))。しかし、HiTrap Q HP カラムでは夾雑物を分離することができなかった。続いて、陰イオン交換カラムの溶出画分を疎水性相互作用カラムである HiTrap Phenyl HP 1 ml カラムに供し、分離を試みた (図 1-5 (b))。しかし、疎水性相互作用カラムでも夾雑物は分離できなかったため、さらにハイドロキシアパタイトカラムに供し分離精製を試みたが、望むような結果が得られなかった (図 1-5 (c))。以上より、C-His-tagged TkoDP1 は金属アフィニティーカラムには結合したが、TkoDP1 の分解物と考えられるバンド、特に TkoDP1 のすぐ下にある TkoDP1 の分解物と考えられるバンドが、分離原理の異なる種々のカラムクロマトグラフィーでも分離することができなかった。

これまでの結果より、高純度な TkoDP1 の精製方法において、N 末端側もしくは C 末端側にタグ配列を付加するという戦略は、大腸菌を利用したタンパク質産生系では高い純度が望めないことが示唆された。従って、TkoDP1 の発現宿主を大腸菌から他の宿主へ変更し、高純度な TkoDP1 の調製を試みた。当研究室の先行研究より、*P. furiosus* 由来のファミリー D DNA ポリメラーゼは酵母 *Pichia pastoris* では上手く産生されなかった結果から、本研究では昆虫細胞 Sf9 による産生系を試みた。

後の生化学解析および構造解析において、タグが付加されていない方が望ましいため、まずは、タグを付加しない野生型 TkoDP1 を産生する組換えバキュロウイルスを作製し、それを昆虫細胞 Sf9 で産生させた。昆虫細胞で産生させた TkoDP1 は、熱処理後の上清の段階で単一のバンドになっていた (図 1-6)。疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーと陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによる精製を経て、高純度な TkoDP1 を精製することができた (図 1-7、1-8)。最終的な収量は昆虫細胞培養液 1 L から約 1.5 mg であった (図 1-9 (b))。Sf9 で産生させた TkoDP1 が高純度に精製できた理由を調べるため、野生型 TkoDP1 を大腸菌で産生させ、昆虫細胞で産生させた TkoDP1 と同様の手順で精製し、TkoDP1 の純度を比べた (図 1-9 (a)、(b))。大腸菌で産生させた場合、熱処理後の上清においても夾雑物であるバンドが見られ、これらの夾雑物は後のカラム精製でも分離することは出来なかった。一方、TkoDP1 を昆虫細胞で産生させた場合、培養液量当たりのタンパク質産生量は大腸菌よりも低下したが、熱処理後の上清において夾雑物はほとんど見られなかった (図 1-9 (a))。TkoDP1 を大腸

菌体内で産生させた場合に生じる夾雑物について、これらが TkoDP1 の分解物であるかを確認するため、ウェスタンブロッティングによる解析を行った (図 1-9 (c))。一次抗体に抗ウサギ-PfuDP1 抗体を用いて TkoDP1 を標識した。大腸菌で産生させた TkoDP1 は、全細胞粗抽出液の段階で多くの夾雑物由来のバンドが検出され、一部は凝集してウェルに蓄積していた (図 1-9 (c) lane 2)。さらに、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー後の最終精製画分にも夾雑物が多く混雑していた (図 1-9 (c), lane 5)。このことから、TkoDP1 を大腸菌で産生させた場合、大腸菌体内で高度に分解を受け、カラムによる精製でもその分解物が分画できないことがわかった。一方、昆虫細胞で産生させた TkoDP1 は、全細胞抽出液画分でほとんどバンドは検出されず、タンパク質の凝集も見られなかった (図 1-9 (c), lane 6)。また、熱処理後の上清および各カラムクロマトグラフィーの精製画分にもバンドはほとんど検出されなかったことから、昆虫細胞で産生された TkoDP1 は昆虫細胞内で分解を受けていないことが示唆された。

1.3.3. TkoDP2 の精製

TkoDP1 と同様、タンパク質産生宿主に大腸菌を選択し、アフィニティータグによる迅速な精製を目指し、HAT タグを付加した N-HAT-tagged TkoDP2 の精製を試みた。

N-HAT-tagged TkoDP2 を大腸菌体内で単独で産生させ、HisTrap FF 5 ml カラムで分画し、SDS-PAGE によって非結合画分と結合画分に溶出された N-HAT-tagged TkoDP2 の割合をバンドの大きさから推定した (図 1-3 (c))。非結合画分の 4000 分の 1 (図 1-3 (c) lane 3) と結合画分の 1000 分の 1 (図 1-3 (c) lane 6) のバンドの大きさから、N-HAT-tagged TkoDP2 は HisTrap FF 5 ml カラムに約 20%程度結合することがわかった。また、非結合画分 (図 1-3 (c) lane 3) と結合画分 (図 1-3 (c) lane 6) を比較すると、分子量約 130,000 に相当する TkoDP2 の分解物と考えられるバンドが、HisTrap FF 5 ml カラムによって濃縮されていた。この結果から、N-HAT-tagged TkoDP2 が金属アフィニティーカラムに対して結合する割合が低いこと、および TkoDP2 の分解物と考えられるバンドもカラムに結合し、夾雑物の濃縮が生じることから、N 末端側にタグ配列を融合させる手法は高純度な TkoDP2 を精製には適していないと判断した。そこで、TkoDP1 と同様、シャペロン共産生下で、C-His-tagged TkoDP2 を産生させ、C 末端側のヒスチジンタグ用いて高純度な精製を目指した。

C-His-tagged TkoDP2 を HisTrap HP 1 ml カラムで精製した (図 1-10)。C-His-tagged TkoDP2 も C-His-tagged TkoDP1 と同様、金属アフィニティーカラムに結合した。金属アフィニティーカラムの結合画分において、夾雑物が検出されたので、分離原理の異なる複数種のカラムを用いて精製条件を検討したところ、夾雑物を分画できることがわかった。さらに条件を検討した結果、夾雑物の分画には、C 末端側のヒスチジンタグによる精製が必須ではないことが

わかった。そのため、後の生化学解析および構造解析を考慮して、タグの付加されていない野生型の TkoDP2 の高純度な精製を目指した。

野生型 TkoDP2 の産生には、大腸菌に pGro7 を導入したものを宿主として用い、TkoDP2 をシャペロンと共産生させることで TkoDP2 が正しい構造をとることを助けた。シャペロンの共産生の有無で、同じ大腸菌体量における TkoDP2 の産生量および可溶化の割合の差を比較した (図 1-11)。シャペロンを共産生させた条件 (+pGro7) で分子量約 60,000 のバンドは pGro7 由来の GroEL である。両条件の全細胞粗抽出液 (TC) を比較すると、TkoDP2 の産生量はほぼ同じであることから、シャペロン共産生による TkoDP2 の産生量の低下は見られなかったが、GroEL を除く他のバンドのパターンがほぼ同様であった。一方、各条件の熱処理後沈殿 (HP) と上清 (HS) の TkoDP2 のバンドの大きさに差が見られ、シャペロン共産生下の方が熱処理後に可溶化している TkoDP2 の量が多かった。各精製段階での TkoDP2 の量を Image J を用いて定量し、各条件における全細胞抽出液画分の TkoDP2 の量を 100 とした相対量を算出した。シャペロンの有無に関わらず約 7 割の TkoDP2 が超音波破碎後の上清に存在していたが、シャペロン非共産生の条件では熱処理後の上清には約 3 割の TkoDP2 しか残存していなかった。一方、シャペロン共産生の条件では熱処理後の上清に約 5 割の TkoDP2 が残存していた。

TkoDP2 とシャペロンと共産生させた大腸菌を超音波破碎し、熱処理後にポリエチレンイミン処理を行った (図 1-12)。その後、硫酸アンモニウム沈殿法による分画、疎水性相互作用カラム HiTrap Butyl HP 5ml カラムによる分離によって核酸を除去し (図 1-13)、HiTrap Heparin HP カラムに供し、塩化ナトリウムの濃度勾配によって溶出し、各画分を SDS- 7.5% PAGE によって分析した (図 1-14)。TkoDP2 の HiTrap Heparin HP 5 ml カラムで展開した画分のうち、0.6 M 以上の塩化ナトリウムで溶出された画分 (図 1-14 (b) 破線部) を回収し、ENrich™ Q 5/50 カラムで 0.1 M から 0.3 M の塩化ナトリウムで展開した結果、塩化ナトリウムの濃度が 0.15 M から 0.20 M までの間で高純度な TkoDP2 が溶出され、0.2 M 以降では分子量約 130,000 の TkoDP2 分解物のバンドを含んだ TkoDP2 が溶出された (図 1-15 (b) (c))。このことから、ENrich™ Q 5/50 カラムを用いることで、アフィニティーカラムである HiTrap Heparin HP カラムで分離できなかった分子量約 130,000 の TkoDP2 由来と考えられる分解物を分画することができた。最終的に大腸菌培養液 1 L から約 1.3 mg の TkoDP2 が得られた。

1.3.4. TkoPolD および変異体 TkoPolD の精製

TkoDP1 および TkoDP2 について、両者ともに野生型のタンパク質の高純度な精製に成功したことから、TkoPolD についてもタグを付加していない TkoDP1 と TkoDP2 を大腸菌で共産生させて高純度な精製を試みた。

TkoDP1 と TkoDP2 を共産生させた大腸菌を超音波破碎し、80°C で熱処理後、ポリエチレンイミン処理によって除核酸を行った (図 1-16)。熱処理後の上清 (HS) およびポリエチレンイミン処理後の上清 (PS) の TkoDP1 と TkoDP2 のバンドの大きさを比較すると、TkoDP1 よりも TkoDP2 の方が大きいことから、TkoPolD を大腸菌で共産生させた場合、TkoDP2 の方が過剰に産生され、複合体を形成していない TkoDP2 を後のカラムクロマトグラフィーで分画する必要が示唆された(図 1-16)。TkoPolD は、その後 70% 飽和硫酸アンモニウム沈殿によって分画後、疎水性相互作用カラムの HiTrap Butyl HP 5 ml カラムに供し、カラム容量の 20 倍の溶液量で展開した (図 1-17)。各画分の夾雑物のうち分子量約 130,000 の高硫酸アンモニウム濃度側で溶出されたもの (図 1-17 (b), I: 橙色破線) は後の ENrich™ Q 5/50 カラムで分離することができた。一方、低硫酸アンモニウム濃度側に溶出される分子量約 130,000 の夾雑物、および分子量約 67,000 の夾雑物 (図 1-17 (b), II: 紫色破線) は、後の HiTrap Heparin HP 5 ml カラムおよび ENrich™ Q 5/50 カラムで分画することができなかった。従って、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーでこれらの夾雑物を含まない画分を回収することで (図 1-17, 黒色破線) 収量は少なくなるものの、TkoPolD の純度を高めることができた。次に、HiTrap Butyl HP 5 ml カラムで回収した画分を HiTrap Heparin HP 5 ml カラムで展開し、各画分を SDS-PAGE で分析した (図 1-18)。約 0.6 M の塩化ナトリウム濃度の時に TkoPolD 複合体が溶出され、塩化ナトリウムが 0.8 M より高塩濃度では余剰の TkoDP2 が溶出されたことから、大腸菌でのタンパク質産生時に余剰に産生された TkoDP2 を HiTrap Heparin HP 5 ml カラムにより分離することができた (図 1-18 (b), II: 青色破線)。分子量約 130,000 のバンドは、次の ENrich™ Q 5/50 カラムで分画できるバンドである (図 1-18 (b), I: 橙色破線)。塩化ナトリウムの濃度変化による TkoDP1 と TkoDP2 のバンドの増減が同じ挙動を示している画分が、TkoPolD 複合体が含まれている画分に相当すると考え、これらの画分を回収し、ENrich™ Q 5/50 カラムに供した (図 1-18, 黒色破線)。最後に、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに ENrich™ Q 5/50 カラムを用いることで、分子量約 130,000 の夾雑物を分離することができた (図 1-19 (b))。この夾雑物は TkoDP2 由来と考えられる。これは同じ陰イオン交換カラムである HiTrap Q HP 1 ml カラムでは分離することはできなかったが、ENrich™ Q 5/50 カラムでは分離することができたため、高純度な TkoPolD を精製するためには ENrich™ Q 5/50 カラムを用いることが非常に効果的であると言える。最終的に、大腸菌培養液 1 L から約 0.63 mg の TkoPolD が得られた。

変異体 TkoPolD も TkoPolD と同様の手順で精製することができた。また、各分離原理の異なるカラムでの挙動および最終的なタンパク質の収量も差はなかった。

1.3.5. 精製タンパク質の純度の検定

前述した方法で精製した TkoDP1、TkoDP2、TkoPolD の各タンパク質を SDS- 7.5% PAGE によって分析し、純度を検定した (図 1-20)。各レーンそれぞれ 12 pmol の物質量のタンパク質を供した。このとき、TkoDP1 は約 1 μ g、TkoDP2 は約 1.8 μ g のタンパク質に相当する。TkoDP1+DP2 のレーンは、それぞれ 12 pmol の TkoDP1 と TkoDP2 を混合したタンパク質溶液を供した。共産生した TkoPolD のうち、上側のバンドが TkoDP2、下側のバンドが TkoDP1 に相当した (図 1-20 lane 2、lane 3、lane 5)。また、バンドの大きさを比較すると、lane 5 の TkoPolD における TkoDP1、TkoDP2 のバンドの大きさは、lane 2 の TkoDP1、lane 3 の TkoDP2 とそれぞれ同等であったことから、TkoPolD は DP1 と DP2 が等モル量で構成された複合体であることが示唆された。また、TkoDP1 のマーカーから見積もられた分子量はおよそ 100,000 と、TkoDP1 のアミノ酸配列から計算される分子量 (80784.2) よりも高分子量側に泳動された。また、精製した変異体 TkoPolD も同様に SDS- 7.5% PAGE によって展開したところ、野生型 TkoPolD と同じ結果が観察された (図 1-20 lane 7)。

1.3.6. 大腸菌および昆虫細胞で産生させた TkoDP1 の活性の差

大腸菌体内で産生させた TkoDP1 と昆虫細胞で産生させた TkoDP1 について、活性に差があるかを検討した。大腸菌および昆虫細胞で産生させた精製 TkoDP1 と、大腸菌体内で産生させた精製 TkoDP2 を等量混合した再構成 TkoDP1+DP2 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定することで、両者に差がみられるかどうかを調べた (図 1-21)。

両宿主由来 TkoDP1 を用いて再構成した TkoDP1+DP2 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性について比較したところ、各反応時間において、産物の量や切断の様式、未反応の基質の量、切断された基質の長さなど、両者に大きな差はみられなかった (図 1-21)。

1.4. 考察

1.4.1. TkoDP1 の精製方法

TkoDP1 は、大腸菌産生系で N 末端側にタグを付加した場合は金属アフィニティーカラムに結合しなかった。また、C 末端側にタグを付加した場合は、金属アフィニティーカラムに結合するものの、様々精製条件を検討しても高純度に精製することはできなかった。一方、産生宿主を変更し、昆虫細胞 Sf9 と組換えバキュロウイルスを利用したタンパク質産生系によって高純度な野生型の TkoDP1 の調製に成功した。

TkoDP1 の産生にはバキュロウイルスと昆虫細胞を用いた産生系が非常に有用であった。ウェスタンブロッティングでの解析の結果から、TkoDP1 を大腸菌体内で産生させた場合、細胞粗抽出液の段階で分解物が見られ、それらは後のカラムクロマトグラフィーによる精製では完全に除くことができなかった。一方、昆虫細胞内で産生させた場合は、産生された TkoDP1 はほとんど分解しておらず、熱処理後の上清でほとんど単一なバンドであった (図 1-6、1-9) ことから、TkoDP1 は昆虫細胞内で Sf9 由来またはバキュロウイルス由来のプロテアーゼによる分解を受けなかった可能性が示唆された。

あるタンパク質の産生について大腸菌と昆虫細胞で比較したとき、昆虫細胞を用いることで産生が改善した例は多いが、その多くが高等生物由来のタンパク質や膜タンパク質であり、産生量の増加やタンパク質の可溶化に関する報告が多い (Osz-Papai et al., 2015)。TkoDP1 が昆虫細胞で分解を受けなかった要因としては、TkoDP1 が昆虫細胞内では大腸菌体内で産生させたときと異なる立体構造をとり、プロテアーゼに分解を受けやすい部分の露出がされなかったこと、または TkoDP1 が昆虫細胞内に存在するプロテアーゼの分解を受けにくいことなどが推測される。昆虫細胞で組換えタンパク質を産生させた時、カテプシンに代表されるバキュロウイルス由来のプロテアーゼや宿主細胞由来の様々なプロテアーゼによって組換えタンパク質が分解を受ける可能性を考慮しなければならない (Ikonomou et al., 2003) が、TkoDP1 の場合は内在性プロテアーゼによる影響を受けなかったのだと推測している。大腸菌よりも昆虫細胞を用いた方がタンパク質の分解が抑制された例に、ゴールデンハムスター由来ブリオンタンパク質について報告されている (Weiss et al., 1995)。

昆虫細胞で組換えタンパク質を産生させた場合、産生させたタンパク質に N 型糖鎖が修飾されることが知られている (van Oers et al., 2015)。オリゴ糖鎖は、オリゴ糖転移酵素により、シークオン配列という保存された配列モチーフである Asn - X -Ser/Thr (X はプロリン以外のアミノ酸) のアスパラギン側鎖中のアミド基に結合される。TkoDP1 のアミノ酸配列中には 239 番目から (Asn - Gly - Ser) と 623 番目から (Asn - Arg - Ser) の 2 ヶ所にシークオン配列があるため、昆虫細胞で産生させた TkoDP1 には、昆虫細胞型の糖鎖が修飾されている可能性がある。糖鎖修飾の有無については本研究では調べていないが、精製したそれぞれのタンパ

ク質を SDS-PAGE で分析した結果、昆虫細胞で産生させた TkoDP1 と、TkoPolD として大腸菌で TkoDP2 と共産生させた TkoDP1 の泳動度は変わらないことから、昆虫細胞で産生させた TkoDP1 に翻訳後に大きな化合物が付加されてはいないと言える (図 1-20 lane 2、lane5)。また、大腸菌で産生させた TkoPolD と、昆虫細胞で産生させた TkoDP1 と大腸菌で産生させた TkoDP2 とを試験管内再構成した TkoDP1+DP2 のポリメラーゼ活性および 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を比較した時、両者の間に大きな差は無かった (図 2-4、図 2-5)。また、大腸菌で産生させた TkoDP1 または昆虫細胞で産生させた TkoDP1 を、それぞれ大腸菌で産生させた TkoDP2 と再構成させて 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の強さを比較した (図 1-21)。この場合も両者の間に差は見られなかったことから、原核生物由来のタンパク質である TkoDP1 を真核細胞である昆虫細胞で産生させても、同じように産生されたと考えられる。

1.4.2. TkoDP2 の精製方法

TkoDP2 は、大腸菌産生系で N 末端側にタグを付加した場合は金属アフィニティーカラムに結合しなかったが、C 末端側にタグを付加した場合は金属アフィニティーカラムに結合した。分離原理の異なる複数種のカラムによる精製条件を検討した結果、大腸菌宿主で金属アフィニティーカラムに寄らない精製方法を確立したため、大腸菌宿主でシャペロンと共産生させ、ENrich™ Q 5/50 カラムによる精製により高純度な野生型 TkoDP2 の調製に成功した。

TkoDP2 産生時において、TkoDP2 が正しく折りたたまれることを狙ってシャペロニンである GroEL と GroES と共産生させた (図 1-11)。シャペロン共産生による TkoDP2 の産生量の低下はなく、シャペロンと共産生させた TkoDP2 は、シャペロンと非共産生の TkoDP2 と比較すると、熱処理後の上清に可溶化している割合が多かった。組換えタンパク質を産生させた場合、すべてのタンパク質が正しい構造をとっていないと予想できる。TkoDP2 は好熱性アーキア由来のタンパク質のため、正しく折りたたまれて最適な構造をとっていた場合、耐熱性があることが期待できる。そのため、熱処理後の上清に残っている TkoDP2 の割合は、宿主内で大量に産生された TkoDP2 のうち、正しく折りたたまれているタンパク質の割合と相関があると推測できる。本研究で、TkoDP2 をシャペロンと共産生させることで熱処理後の上清に残存した TkoDP2 の割合が増加したことは、シャペロンによって TkoDP2 が正しく折りたたまれたと考えられる。よって、シャペロンとの共産生には TkoDP2 の正しい折りたたみを助ける効果があったと考えている。本研究ではシャペロンによるタンパク質の折りたたみの効果が認められたこと、および、シャペロン共産生による TkoDP2 の産生量の低下が観察されなかったことから、TkoDP2 とシャペロンを共産生させることにした。

TkoDP2 は、分離原理の異なる複数種のカラム精製により夾雑物を取り除くことができたが、そのなかで最も効果的であったのは ENrich™ Q 5/50 カラムであった (図 1-15)。ENrich™ Q5/50 カラムについて、担体の組成や粒子径などは公表されていないため、TkoDP2 および TkoPolD の精製に効果があった理由は推測しかできない。ENrich Q 5/50 カラムと他の陰イオン交換カラムとでは、担体に付加されている陰イオン交換基の親水性と疎水性の度合いや、

担体の粒子の大きさや形状などの違いが考えられる。これら複数の要素が上手く効果を発揮した結果、TkoDP2 の高純度な精製につながったのだと考えている。

1.4.3. TkoPolD の精製方法

TkoPolD は、大腸菌宿主で野生型 TkoDP1 と野生型 TkoDP2 を共産生させ、疎水性相互作用カラム、アフィニティークラム、および陰イオン交換カラムでの精製を工夫することにより高純度な TkoPolD の調製に成功した。

TkoPolD は大腸菌を用いて TkoDP1 と TkoDP2 を共産生させた。両者の共産生には、一つの大腸菌に pET24a-TkoDP1 と pET21a-TkoDP2 という同じ ColEI 型レプリコンのプラスミドの両方を挿入し、それを抗生物質による選択圧で保持させた。一度に二種のプラスミドを用いて大腸菌を形質転換させるのは形質転換効率が低く困難であったため、一度 pET21a-TkoDP2 で形質転換させた大腸菌を再びコンピテントセル化し、再度 pET24a-TkoDP1 で形質転換させることで、二種のプラスミドを大腸菌体内に維持させることができた。この場合、pET 系プラスミドの総コピー数は一定だが pET24a-TkoDP1 と pET-21a-TkoDP2 の量比は細胞によって異なっていると考えられる。実際にタンパク質を産生させると、TkoDP2 の産生量の方が TkoDP1 よりも多かった (図 1-16、図 1-18)。両プラスミドのコピー数は調べていないが、TkoDP1 と TkoDP2 の産生量の比が大腸菌体内における pET24a-TkoDP1 と pET-21a-TkoDP2 の量比を反映している可能性はある。

TkoPolD のカラムクロマトグラフィーによる精製において、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーで分取する画分に気を付けなければいけない (図 1-17)。疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーの濃度勾配をカラム容量の 20 倍の溶液量で展開することによって夾雑物を分画し、最終的に高純度な TkoPolD を得ることができた (図 1-17)。疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーによる分画で TkoPolD の精製度が高まったことについて、TkoPolD は TkoDP1 と TkoDP2 の複合体であるため、試料溶液中には各サブユニットの分解物だけではなく、それぞれの全長のサブユニットまたはその分解物同士が複合体を形成した「分解物複合体」が混在していると予想できる。陰イオン交換カラムやアフィニティークラムはタンパク質の等電点や DNA への結合活性を利用して精製を行う手法であるが、TkoPolD 分解物複合体の等電点や DNA への結合活性が全長の TkoPolD 複合体とほとんど同じであったために、これらのカラムを利用した手法では分画できなくなったのかもしれない。一方、分解物複合体は、全長ではないため本来タンパク質の内部に折りたたまれるはずの疎水性残基がタンパク質表面に露出している可能性がある。このような分解物または分解物複合体はタンパク質の疎水性度が高く、全長の TkoPolD 複合体よりも疎水性相互作用カラムと強く相互作用したために、他の分離原理のカラムで分離できなかった分解物を分画することができたのではないかと考えている。実際のカラムクロマトグラフィーの結果でも、分解物を多く含んでいる画分が低

塩濃度において溶出されていることから、分解物は疎水性相互作用カラムに強く相互作用していることがわかる (図 1-17 (a) (b))。

TkoDP2 の精製において ENrich™ Q 5/50 カラムが効果的であったのと同様に、TkoPolD の精製においても ENrich™ Q 5/50 カラムが非常に効果的であった (図 1-19)。

1.4.4. 精製タンパク質の純度の評価

TkoDP1、TkoDP2、TkoPolD の各タンパク質の純度を SDS- 7.5% PAGE によって検定した (図 1-20)。各タンパク質は 12 pmol が泳動されており、重量に換算すると、TkoDP1 が約 1 µg、TkoDP2 が約 1.8 µg である。単純に両者の重量比から推測される TkoDP2 のバンドの大きさは TkoDP1 の約 2 倍であるが、実際の結果は、TkoDP2 のバンドは TkoDP1 のバンドの 3 倍から 4 倍程度に見える (図 1-20 lanes 4、lane 5)。しかし、各レーン間でバンドの大きさを比較すると、lane 5 の TkoPolD における TkoDP1 と TkoDP2 のバンドの大きさは、lane 2 の TkoDP1、lane 3 の TkoDP2 とそれぞれ同等であった。このことより、TkoPolD は TkoDP1 と TkoDP2 が等モル量で構成された複合体であることが強く示唆された。また、TkoDP1 のマーカーから見積もられた分子量はおよそ 100,000 と、TkoDP1 のアミノ酸配列から計算される分子量 (80,784.2) よりも高い位置に泳動された。このことについて、*P. furiosus*、*P. horikoshii*、*P. abyssi*、*Thermococcus* sp. 9°N 由来の TkoDP1 についての先行研究でも同様の現象が報告されている (Greenough et al., 2014; Gueguen et al., 2001; Shen et al., 2001; Uemori et al., 1997)。天然変性領域を有するタンパク質を SDS-PAGE によって分画したとき、実際の分子量より高分子量側に泳動されることがわかっている (Tompa, 2012; Tsai et al., 2007)。TkoDP1 の N 末端側 65 番目から 290 番目の領域は天然変性領域であると予想され (図 2-3 (a) (b))、また実際に、60 番目から 228 番目の領域を N-His-tagged TkoDP1(60-228) として産生させ (図 2-3 (c))、CD スペクトルが測定された結果、特別な構造を有していなかった (図 2-3 (d))。また、この N-His-tagged TkoDP1(60-228) を SDS-PAGE で分析した結果、アミノ酸配列から計算された分子量 (19435.13) よりも高分子量側に泳動されていた (図 2-3 (c))。PabDP1 および PhoDP1 についても TkoDP1 と同様、N 末端側に進化学的に保存されていない領域があると報告されている (Sauguet et al., 2016; Yamasaki et al., 2010)。これらのことより、TkoDP1 は N 末端側に天然変性領域を有するために SDS-PAGE では実際の分子量よりも高分子量側に泳動されたのだと考えた。

以上より、本研究で確立された精製方法により、TkoDP1、TkoDP2、TkoPolD および変異体 TkoPolD は高純度に精製することができたと結論付けた。

第二章 ファミリーD DNA ポリメラーゼの生化学解析

2.1. 序論

第一章の序論で述べた通り、現在までにファミリーD DNA ポリメラーゼの性状は様々な種類のアーキアで調べられている。各種由来のファミリーD DNA ポリメラーゼについてそれぞれ生化学的な性質が調べられているが、多量体構造やサブユニット単独での活性について、報告されている性質には種間での違いも多くみられる。

種々のアーキア由来ファミリーD DNA ポリメラーゼに共通する性質として、大小二つのサブユニットの複合体である、高いヌクレオチド取込み活性およびプライマー伸長活性を有している、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており校正機能を有している、という特徴が挙げられる。ファミリーD DNA ポリメラーゼ複合体を形成する大小サブユニットの構成比には二種類報告されている。*P. furiosus*、*P. abyssi*、*M. jannaschii*、*Thermococcus* sp. 9°N 由来ファミリーD DNA ポリメラーゼは大小二つのサブユニットから成るヘテロ二量体である (Greenough et al., 2014; Gueguen et al., 2001; Ishino et al., 1998; Uemori et al., 1997) が、*P. horikoshii* においては各サブユニットのホモ二量体から構成されるヘテロ四量体であると報告されている (Shen et al., 2001)。*P. horikoshii* において、さらに、SPR 法による解析から PhoDP2 のN末端から 50 アミノ酸残基が PhoDP2 の二量体構造の形成に必要であると報告されており (Tang et al., 2004)、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる解析から PhoDP1 の1番目から 100 番目と PhoDP2 の 792 番目から 1163 番目がヘテロ四量体を形成することが報告された (Matsui et al., 2011)。これらの理由から PhoPolD は四量体を形成するとされている。ただし、PhoDP2 における SPR 法の解析を除けば、多量体構造の決定はすべてゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分析結果に基づいている。ファミリーD DNA ポリメラーゼ複合体の分子量が大きいこととゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出体積は分子の構造に影響を受けことから、この手法での多量体構造の決定が難しく、ファミリーD DNA ポリメラーゼの多量体構造については議論が続いている。

ポリメラーゼ活性について、ポリメラーゼモチーフおよび活性に必要な残基は大サブユニットの配列中に保存されている。大サブユニット単独でのポリメラーゼ活性については、*P. furiosus* (Uemori et al., 1997)、*M. jannaschii* (Ishino et al., 1998)、*Thermococcus* sp. 9°N (Greenough et al., 2014)、*P. horikoshii* (Shen et al., 2004a)、*A. fulgidus* (Abellón-Ruiz et al., 2016) で報告されている。*P. furiosus*、*M. jannaschii*、*Thermococcus* sp. 9°N においては大サブユニット単独でのポリメラーゼ活性は検出されなかったが、*P. horikoshii*、*A. fulgidus* の報告では、大サブユニットのみでポリメラーゼ活性が検出されている。ポリメラーゼ活性について、検出方法や基質 DNA の構造や調製方法、タンパク質の純度などの要素によって検出値が大きく変わること留意すべきであり、大サブユニット単独での活性の有無により安易に二種に分けられるよう

な特徴ではない。ただし、いずれの種由来のファミリーD DNA ポリメラーゼも小サブユニットと複合体を形成すると単独の時よりも高いポリメラーゼ活性を示すことがわかっている。

3'-5'エキソヌクレアーゼ活性について、*P. furiosus* (Uemori et al., 1997)、*Thermococcus* sp. 9°N (Greenough et al., 2014)、*M. jannaschii* (Jokela et al., 2004) および *P. horikoshii* (Shen et al., 2004a) において調べられている。*P. furiosus* および *Thermococcus* sp. 9°N において、小サブユニットのみで活性は検出されなかったが、*P. horikoshii* と *M. jannaschii* では高濃度のタンパク質と二価金属イオンにマンガンイオンを用いた条件で、小サブユニットのみで活性が検出されている。ポリメラーゼ活性の場合と同様、いずれの種由来のファミリーD DNA ポリメラーゼも大小二つのサブユニットが複合体を形成したときに顕著な活性が検出されている。また、*P. horikoshii* において、部分構造変異体の研究から、PhoDP2 の C 末端 50 残基を欠失させても 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性には影響がないことが分かっている。さらに PhoDP2 の C 末端側にあるシステインクラスターII 中の 12 アミノ酸からなるペプチドによって、PhoDP1 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が促進されることが報告されている (Shen et al., 2003, 2004b)。また、PhoDP1 の活性部位変異体の研究結果から、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に必須なアミノ酸残基が同定されている (Shen et al., 2004a)。

DNA 結合活性については、*P. furiosus* (Richardson et al., 2013)、*P. horikoshii* (Shen et al., 2003)、*P. abyssi* (Castrec et al., 2010; Henneke et al., 2005) で調べられている。測定に用いた基質の長さや構造および測定方法や条件によって測定値に大きな差があり、単純に値だけで比較することはできないが、ssDNA よりも dsDNA や primed DNA に対して強い結合活性が検出されている。しかし、サブユニット単独での DNA 結合活性について調べた報告はない。

本章では、ファミリーD DNA ポリメラーゼの性質解明のため、第一章の方法により高純度に精製した TkoDP1 と TkoDP2 および共産生させた TkoPolD を用いて種々の生化学的性状の同定を試みた。まずは TkoPolD の多量体構造について検証するため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィー、静的光散乱による解析を行った。また、構造情報を得るために電子顕微鏡による単粒子解析を試みた。次に TkoDP1、TkoDP2 の各サブユニット、再構成した TkoDP1 + DP2 および共産生させた TkoPolD を用いて、ヌクレオチド取込み活性、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性、DNA 結合活性についてそれぞれ調べた。これらの結果を各種アーキア由来のファミリーD DNA ポリメラーゼの性質と比較することで、ファミリーD DNA ポリメラーゼの理解を深めていきたい。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 反応溶液組成一覧

実験に用いた溶液の組成を次に記す。

再構成溶液	50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 50% glycerol, 0.1% Tween 20, 0.1% Igepal, pH8.0
希釈溶液	50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 0.1% Igepal, pH8.0
反応溶液	20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, pH 8.0
アニーリング溶液 I	10 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl ₂ , 5 mM KCl, 5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.5 mM DTT, pH 8.0
アニーリング溶液 II	20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0

2.2.2. TkoDP1+DP2 の試験管内再構成条件

本研究では TkoDP1 と TkoDP2 を試験管内で再構成させたものを TkoDP1+DP2 と表記する。等量の TkoDP1 と TkoDP2 を、再構成溶液を用いて混合した後、72°C で 3 分間加温した。以降の実験で特に記載のない限り TkoDP1+DP2 を使用する場合は、この方法で再構成したものをを用いた。

2.2.3. ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の測定

精製した各タンパク質の濃度を 4 μ M に調製し、40 μ l をカラムに供した。ゲルろ過カラムは Superdex 200 PC 3.2/30 カラム (GE Healthcare 社) を使用し、SMART System (GE Healthcare 社) を用いて室温で行った。バッファーは 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM DTT pH 8.0 を用い、流速 40 μ l/min で分析を行った。分子量マーカールには、ゲルろ過スタンダード #1511901 (Bio-Rad Laboratories 社) を用いた。

2.2.4. 静的光散乱による重量平均分子量測定の原理

光散乱を用いたタンパク質の分子量の決定について過去の文献で詳細に述べられている (Wen et al., 1996)。本項では、光散乱検出装置 Viscotek TDAmx (Malvern 社) を用いる場合におけるタンパク質の重量平均分子量の原理を説明する。

静的光散乱の基本式は Rayleigh の方程式で定義され、(1)式のように表される。

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \left[\frac{1}{M_w} + 2A_2c \right] \frac{1}{P(\theta)} \quad (1)$$

$R(\theta)$ は Rayleigh 比、 K^* は光学パラメーターを示し、 $4\pi^2 n_0^2 (dn/dc)^2 / N_A \lambda_0^4$ で表される定数である。 n_0 は溶媒の屈折率、 c は溶質の重量濃度 (mg/ml)、 dn/dc は溶質の屈折率の濃度増分、 N_A はアボガドロ定数、 λ_0 は真空中での入射光の波長、 M_w は重量平均分子量、 A_2 は第二ビリアル係数という溶質分子の溶液への分散状態を表す係数である。 $P(\theta)$ は散乱光の角度依存性と分子の大きさに依存する項であり、次の式であらわされる。

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} \langle r_g^2 \rangle \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (2)$$

ここで $\langle r_g^2 \rangle$ は平均二乗慣性半径である。Rayleigh の方程式から、光散乱は分子量と分子の大きさと溶質の濃度に依存していることがわかる。

静的光散乱において、光散乱検出器をゲルろ過カラムクロマトグラフィーと連結して測定する実験系は、ゲルろ過カラムによって目的タンパク質を分画すると同時に、バッファー交換および微粒子によるノイズを除去することができるため、タンパク質分子の分析において非常に有効な手法である (Wen et al., 1996)。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーから溶出されたタンパク質を分析する場合は、溶質の濃度が希薄な条件であると仮定でき、このような条件下では第二ビリアル係数を無視することができる。また、糖鎖修飾を受けていないタンパク質の屈折率の濃度増分 dn/dc の値はアミノ酸配列に依存せず 0.185 ml/g と一定であるとしてよい。さらに、(2) 式で定義される散乱角の角度依存性については、一般的には溶質分子の直径が測定波長の 1/20 以下の場合は光散乱の角度依存性は無くなり、等方散乱として扱ってもよい。静的光散乱では、測定に 633 ~ 670 nm の波長のレーザー光を用いることが多いため、根平均二乗慣性半径 $\langle r_g^2 \rangle^{1/2}$ が 15.8 ~ 16.8 nm 以下の場合は、(2) 式の角度依存性の項を無視することができる、(2) 式は $1/P(\theta) = 1$ となる。従って、(1) は次式のように近似できる。

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{M_w}$$

$$R(\theta) = K^*M_w c \quad (3)$$

なお等方散乱として扱う場合、どの散乱角度を用いても良いが、一般的には S/N 比の良い 90°で測定する方が望ましい。

Rayleigh 比は散乱光強度を散乱角 θ の関数として表す時の物理量で、次の式で定義される。

$$R(\theta) = \frac{I r^2}{I_0 V_\theta} \quad (4)$$

I は散乱光強度、 I_0 は入射光強度、 r は散乱点からの距離、 V_θ は散乱体積の角度依存性を示している。

続いて、測定装置の校正について記述する。測定装置の校正には分子量既知の標準タンパク質を用いた校正と、Rayleigh 比が既知の物質を用いた校正の 2 種類があるが、本研究では標準物質を用いて校正を行った。

光散乱検出器で検出される光強度を I_{LS} とすると、(3) (4) 式より (5) 式が導ける。

$$I_{LS} = \frac{I_0 V_\theta}{r^2} K^* M_w c$$

$$I_{LS} = K_{LS} M_w c \quad (5)$$

ここで、 $K_{LS} = I_0 V_\theta / r^2 K^*$ とすると、 K_{LS} は光散乱検出器の装置定数を示している。この装置定数 K_{LS} を、標準タンパク質を用いてあらかじめ算出しておき、未知試料を同条件で測定することで、(5) 式より未知試料の重量平均分子量 M_w を求めることができる。

分子量既知の標準タンパク質を用いた校正には次のような利点がある (Wen et al., 1996)。一つ目に、簡便に校正や検定を行えることである。これは、測定装置の動作が不安定で都度校正を行わなければならないような状況では大きなメリットである。二つ目に、実際の測定系と同じ条件で校正できることである。Rayleigh 比既知の物質を用いることによる絶対校正では、標準物質 (トルエンなどがよく用いられる) から実際の測定系である水層への溶媒交換が必要であり、交換時に検出装置に塩が析出する危険性を孕む。しかし、標準タンパク質を用いた校正方法では、このようなリスクも回避することができる。

2.2.5. 静的光散乱による絶対分子量の測定

スペクトリス株式会社マルバーン事業部の松尾遼太郎氏の協力によって本実験を行った。精製されたタンパク質の分子量は均一であることから、精製タンパク質の重量平均分子量は絶対分子量と考えられる。静的光散乱によるタンパク質の絶対分子質量の測定は、Viscotek TDAmix (Malvern 社) を用いて行い、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーのカラムには Superdex 200 10/300 カラム (GE Healthcare 社) を用いた。大腸菌で産生させた精製 TkoDP1 および TkoPolD をそれぞれ 1.0 mg/ml、1.5 mg/ml の濃度に調製し、それぞれ 150 μ l カラムに供し、ランニングバッファー (50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM DTT, pH 8.0) を流速 0.4 ml/min で送液を行った。ゲルろ過カラムより溶出された溶液について示差屈折率および散乱光強度を測定した。光散乱は波長 670 nm のレーザー光で S/N 比の良い 90°直角度散乱 (Right Angle Light Scattering, RALS) を測定した。結果の解析については前項で述べた原理に基づいて行い、散乱光強度から Rayleigh 比を、示差屈折率からは溶質の濃度を算出し、前項 (5) 式から絶対分子量を算出した。装置定数 K_{LS} の校正には、標準試料として単量体の BSA を用いた。すべての測定は 27°C で行った。測定結果は OmniSEC software v5 を用いて解析した。

2.2.6. TkoDP1 の天然変性領域の予測

本実験は、我々の研究グループで先行研究として行われた。*T. kodakarensis*、*P. horikoshii*、*P. abyssi*、*P. furiosus* の DP1 の N 末端領域のアミノ酸配列のアラインメント作製には MAFFT (Katoh et al., 2017) を用いた。PhoDP1(1-72) と PabDP1(144-303) の二次構造には PDB ID: 2KXE と 5IHE を用いた。TkoDP1 の変性領域の予測には DISOPRED3 (Jones and Cozzetto, 2015) を用いた。

2.2.7. TkoDP1 の予測天然変性領域の CD スペクトル測定

本実験は、我々の研究グループで先行研究として行われた。TkoDP1 の 60 番目から 228 番目に相当する遺伝子配列を pET24a-TkoDP1 を鋳型にして PCR で増幅した。PCR のプライマーには DP1-60F: dCGCGCATATG ATAATTTCCA GTGGAAATGG TGCCC と DP1-228R: dGGGGCGGCCG CTTAGTTTTTC ATCGGGAAAT TCTCCTTC を用いた (配列中の下線部は制限酵素認識配列)。増幅された PCR 産物は制限酵素 NdeI と NotI を用いて切断し、同じ酵素で切断した鋳型プラスミド pET28TEV (home made) にクローニングした。pET28TEV-TkoDP1(60-228) を用いて *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL を形質転換した。終濃度が 1 mM になるように IPTG を添加することで His-tagged TkoDP1(60-228) を産生させた。His-tagged TkoDP1(60-228) は Ni-NTA アガロース (QIAGEN 社) を用いて精製した。バッファーには 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl を溶出にはこのバッファーに 0.2 M イミダゾールを加えたものを用いた。精製後のサンプルを 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) に対して透析することでバッファーの交換を行った。精製した His-tagged TkoDP1(60-228) は SDS-12.5% PAGE によって分画し CBB 染色によって検出した。

50 mM のリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) に 20 μ M の His-tagged TkoDP1(60-228) を溶かしたタンパク質溶液の CD スペクトルを室温で J-820 spectropolarimeter (JASCO) で測定した。測定のパラメーターは time constant: 1 秒、scan speed: 50 nm/min、bandwidth/resolution: 1 nm、sensitivity of the spectropolarimeter: 100 mdeg に設定した。

2.2.8. 透過型電子顕微鏡による単粒子解析

九州大学生体防御医学研究所の真柳浩太助教の協力により本実験を行った。酢酸ウラニルによる負染色法による観察と解析は次のように行った。濃度を 120 μ g/ml に希釈した TkoPolD 溶液を 3 μ l 分取し、カーボン支持膜に滴下し、1 分間風乾させた後、2%酢酸ウラニルを 3 回浸潤させることによって負染色を行った。カーボン支持膜上のタンパク質に、透過型電子顕微鏡は T20 (FEI 社) を用いて 200 kV の加速電圧で電子線を照射し、投影像を Eagle™ 2k CCD (FEI 社) で 2.77 Å/画素の条件で測定した。撮影は、電子線による試料の損傷を抑えるため Low Dose 法を用いた。Low Dose 法とは、実際の撮影場所とは異なる場所で焦点を合わせることに より、目的タンパク質の電子線による損傷を抑える撮影手法である。取得した TkoPolD 粒子の投影像から、画像解析ソフト EMAN を用いて 17140 個の粒子を選別し、取得した粒子のアライメント、クラス分けおよび平均化の処理を行った。

クライオ電子顕微鏡観察法による観察と解析は次のように行った。カーボン孔開グリッド (quantifoil R1.2/1.3 on Au 200 mesh) にイオンスパッタ MC1000 (日立ハイテクノロジーズ社) を用いて純金を蒸着させることで、金孔開グリッドを作製した。作製したグリッドは使用前

に HDT-400 (JEOL 社) を用いて一分間グロー放電させた。2 μ l のサンプルをグリッドに乗せ、EM GP (ライカ社) を用いて急速冷凍させた。試料を Tecnai G2 Polara (FEI 社) で 200 kV の加速電圧で撮影した。イメージングフィルター GIF Tridiem (Gatan 社) を用いて非弾性散乱した電子を取り除くことでゼロロス像を Gatan 2k CCD カメラで撮影した。各画像のコントラストは Gctf (Zhang, 2016) によって見積り、単粒子像は Gautomatch ソフトウェアを用いて選別した。Relion2.0 を用いて二次元クラスで TkoPolD を計算した。

TkoPolD の推定原子モデルは PabDP1(144-622) (PDB ID: 5IHE) と PabDP2(1-1061) (PDB ID: 5IJL) を基に Chimera ソフトウェア (Pettersen et al., 2004) を用いて作製した。

2.2.9. 基質 DNA の調製

3'-5'エキソヌクレアーゼ活性および DNA 結合活性測定に使用した基質 DNA は次のものを組み合わせて使用した (表 2-1)。ssDNA には 5'側に蛍光物質 Cy5 を付加した 32 塩基の DNA である Cy5pri32: 5' Cy5-CGAACTGCCT GGAATCCTGA CGACATGTAG CG-3'を用いた。dsDNA には Cy5pri32 とそれに相補的な塩基配列をもつ DNA rc32: 5'-CGCTACATGT CGTCAGGATT CCAGGCAGTT CG-3'を、primed DNA には Cy5pri32 とそれに相補的な塩基配列を含む 45 塩基の DNA temp45: 5'-TGAGGTGATC GTTCGCTACA TGTCGTCAGG ATTCCAGGCA GTTCG-3'をアニールさせて用いた。dsDNA および primed DNA は、アニーリング溶液 I に蛍光標識 DNA とその二倍量の相補鎖 DNA を混合し、熱変性させた後、空冷することでアニーリングさせた。二価金属イオンを含まない条件での primed DNA のアニーリングには、アニーリング溶液 II を用いて上と同じ条件でアニーリングを行い、primed DNA(DM free) とした (DM: divalent metal ion)。

プライマー鎖 3'末端側にミスマッチ塩基対を含む primed DNA は、次のように設計した。temp45 の 5'末端側から 14 番目の塩基を T に変えた temp45_14T、同様に 14 番目、15 番目を T に変えた、temp45_14TT、14 番目、15 番目、16 番目を T に変えた temp45_14TTT を設計し、それぞれを 5' Cy5-pri32 とアニーリング溶液 II を用いてアニーリングさせ、primed DNA-1MM、primed DNA-2MM および primed DNA-3MM (MM: mismatch) を調製した。

2.2.10. ヌクレオチド取込み活性の測定

DNA ポリメラーゼ活性は、[methyl-³H] dTTP の酸不溶性画分への取込み活性を測定した (Ishino et al., 1992; Uemori et al., 1995; Yamagami et al., 2014)。反応は、反応液量 40 μ l で行い、基本反応溶液に 2 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、130 nM [methyl-³H]dTTP、0.2 mg/ml 活性化鮭精子 DNA を加えて反応溶液を調製し、3 nM の各タンパク質を加えて反応を開始させた。72°C で 2.5、5、10 分間反応させた後、10 μ l の反応液を DE81 フィルター (GE Healthcare 社)

に滴下し、放射性同位体を取り込んだ DNA をフィルターに吸着させた。フィルターを 5% リン酸水素二ナトリウム水溶液で 3 回洗浄することで未反応の [methyl-³H] dTTP を取り除いた後、フィルター上の [methyl-³H] dTTP の DPM 値を液体シンチレーションカウンター AccuFLEX LSC-8000 (HITACHI 社) で測定した。測定した DPM 値を縦軸に、反応時間を横軸にとってプロットし、比例関係が成立する時間範囲から 30 分間で活性化 DNA に取込まれる [methyl-³H] dTTP の DPM 値を算出し、反応溶液中の全 DPM 値との割合から 30 分間で取込まれた dNTP 量を算出した。72°C において、30 分間で 10 nmol の dNTP が DNA 鎖中に取り込まれる活性を 1 unit と定義し、各タンパク質について 1 nmol あたりの比活性 (unit/nmol) を算出した。反応のコントロールおよび比較対象として TkoPolB および PfuPolB のヌクレオチド取込み活性を TkoPolD と同条件で測定した。

TkoDP1 と TkoDP2 の様々な量比におけるヌクレオチド取込み活性の測定は、上と同様の条件で行った。各量比における TkoDP1 と TkoDP2 の再構成の条件は次のように行った。各タンパク質を再構成溶液で 125 nM の濃度に調製した後、それぞれの量比になり、かつ全量が 15 μ l 程度になるように混合した (例えば、TkoDP1 : TkoDP2 = 0.75 : 1 の場合は、TkoDP1 6 μ l と TkoDP2 8 μ l を混合した)。その後、72°C で 3 分間加温し、基準とする方のタンパク質の最終濃度が 3 nM になるように反応溶液に添加し、反応を開始させた。反応の手順および比活性の算出は先述の方法と同様に行った。

TkoDP1 と TkoDP2 について、ヌクレオチド取込み活性の検出感度を上げるため、反応液中に含まれる dNTP の濃度を低くした系でも調べた。前述の基本反応溶液に 2 mM MgCl₂、2 μ M dNTP、130 nM [methyl-³H]dTTP、0.2 mg/ml 活性化鮭精子 DNA を加えて反応溶液を調製し、3 nM および 12.5 nM の TkoDP1、TkoDP2 タンパク質を加えて反応を開始させ、上と同様の手順で取込んだ dNTP 量と比活性を算出した。各条件におけるヌクレオチド取込み量の検出下限を次のように定義した。シンチレーションカクテルのみで測定した DPM 値の 3 倍を閾地として設定し、検出下限の比活性の値は 3 nM のタンパク質を 10 分後反応させたと仮定して算出した。

2.2.11. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の測定

3'-5'エキソヌクレアーゼ活性測定は、5 nM の基質 DNA と 2 mM の塩化マグネシウムを含む基本反応液を 20 μ l 調製し、一定量のタンパク質を加えて反応を開始させた。基質には 5 nM の ssDNA、dsDNA および primed DNA を使用した。65°C で 2.5、5、10、20 分間反応を行い、溶液量の二倍量のホルムアミドを加えて反応を停止させた。各反応におけるタンパク質量は、TkoDP1、TkoDP2 は 400 nM、TkoDP1+DP2 および TkoPolD は 10 nM、変異体 TkoPolD は 100 nM である。マグネシウムイオン非存在の条件下では、基本反応液に 5 nM の primed DNA(DM

free) を加えた反応溶液および基本反応液に 5 nM の primed DNA(DM free) と 100 mM EDTA を添加した反応溶液を調製し、400 nM の TkoPolD を添加して 20 分間反応を行った。TkoDP2 および変異体 TkoPolD、マグネシウムイオン非存在条件では、反応を停止液 (25 mM EDTA, 0.1% SDS) を加えて反応を停止させた後、0.25 mg/ml プロテナーゼ K (ナカライテスク社) を加えて 50°C で一晩反応させ DNA に結合したタンパク質を除いた後、溶液量の二倍量のホルムアミドを加えた。反応産物は、8 M の尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて TBE バッファー中で変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動をすることで分析した (8 M urea-15% PAGE)。電気移動後、ゲルをイメージアナライザーTyphoon Trio+で可視化した。細胞内の二価金属イオン濃度における 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性測定は、5 nM の基質 DNA を含む基本反応液に 100 mM の塩化マグネシウムと 0.1 mM の塩化マンガンを含め片方または両方加えたものを 20 μ l 調製し、終濃度 10 nM となるように TkoPolD を加えて反応を開始させた。基質には 5 nM の primed DNA、primed DNA-1MM、primedDNA-2MM および primed DNA-3MM を使用した。65°C で 2.5、5、10、20 分間反応を行い、dsDNA を完全に変性させるために溶液量の五倍量のホルムアミドを加えて反応を停止させた。反応産物をゲルにロードする直前に、98°C で 2 分間加熱後氷上で急冷を三回以上繰り返すことで dsDNA を完全に変性させた。8 M の尿素を含む 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて TBE バッファー中で変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動をすることで分析した (8 M urea-15% PAGE)。電気移動後、ゲルをイメージアナライザーTyphoon Trio+で可視化した。

2.2.12. DNA 結合活性の測定

DNA 結合活性はゲルシフトアッセイによって検出した。5 nM の基質 DNA を含む基本反応液を 20 μ l 調製し、様々な濃度 (0、5、10、20、40、80、160、320 nM) の各タンパク質を加えたあと、40°C で 10 分間加温した。加温後の溶液に 4 μ l の 17%フィコール溶液を加えた (終濃度: 3%)。アガロースゲルは、あらかじめ 0.1 $\times$ TAE バッファー中で 100 V で 30 分間泳動を行った。反応産物は 50 V の電圧で約 40 分間電気泳動を行うことで分析した。ゲルはイメージアナライザーTyphoon Trio+で可視化した。

各バンドの定量および解離定数 (K_D 値) の算出は次のように行った (Komori et al., 1999)。バンドの定量は、ImageQuant TL (GR Healthcare 社) を用いて行い、各レーンにおける全バンド強度 (レーン全体) と非結合 DNA のバンド強度をそれぞれ定量した。全バンド強度から非結合 DNA のバンド強度を引いたものをタンパク質-DNA 複合体のバンド強度と定義し、全バンド強度におけるタンパク質-DNA 複合体の割合を算出した。算出したタンパク質-DNA 複合体の結合率から次の式を用いて K_D 値を算出した。

$$\frac{1}{r} = 1 + \frac{K_D}{[A]_{total}}$$

式中の r はタンパク質-DNA の結合率、 $[A]_{total}$ は全タンパク質量を表している。それぞれの条件で測定を四回以上行い、各測定において、濃度の逆数を横軸に、結合率の逆数を縦軸にとり、最小二乗法を用いて近似直線を求めることで各測定における K_D 値を算出し、その平均値と標準誤差を算出した。

DNA 結合活性の二価金属イオン依存性は次のように検出した。基本反応液に 5 nM の基質 DNA を加えたものを 20 μ l 調製し、TkoPolD (0, 5, 10, 20, 40 nM) を加え加温した。二価金属イオンが存在する条件では、2 mM の塩化マグネシウムまたは 10 mM の塩化マンガンを添加した。後の操作は先述の方法と同様に行った。

2.3. 結果

2.3.1. ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の測定

精製した各タンパク質をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで分析した (図 2-1)。TkoDP1、TkoDP2 および TkoPolD 全てのタンパク質が単一のピークで溶出された (図 2-1 (a), (b), (d))。また、再構成した TkoDP1+DP2 も単一のピークが TkoPolD と同じ溶出位置で検出されたことから、再構成された TkoDP1+DP2 の多量体構造は TkoPolD と同じであることがわかった (図 2-1 (c))。溶出されたピークの面積より TkoDP1+DP2 の再構成率を算出したところ、その再構成率は 93%であった。

各タンパク質について、溶出体積より分子量を算出したところ、TkoDP1 は 190,000、TkoDP2 は 170,000、TkoDP1+DP2 および TkoPolD は 370,000 であった。TkoDP1 の溶出体積から計算された分子量とアミノ酸配列から計算された分子量の比を計算すると、TkoDP1 (MW: 80784.2) は約 2.3 倍、TkoDP2 (MW: 150178.4) は約 1.1 倍であった。TkoPolD は、TkoDP1 と TkoDP2 が一分子ずつで複合体構造をとったヘテロ二量体であると仮定した場合 (MW: 230962.6) は約 1.6 倍であった。

2.3.2. 静的光散乱による絶対分子量の測定

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出体積から算出した見かけの分子量とアミノ酸配列から算出した分子量が異なった TkoDP1 および TkoPolD について、静的光散乱で各タンパク質の絶対分子量の測定を行った (図 2-2)。TkoDP1 および TkoPolD において、両者とも示唆屈折率から計算した濃度は 100–500 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であった。TkoDP1 は、保持容量 13.5 ml の時に最も示差屈折率が高かった。また、TkoDP1 が溶出されている時の 90°直角度散乱の散乱光強度算出された絶対分子量は 72,000 から 75,000 の間で安定しており、もっとも示唆屈折率の高い画分における TkoDP1 の絶対分子量は 73,599 であった (図 2-2 (a))。TkoPolD は、保持容量 11.2 ml の時に最も示唆屈折率が高く、TkoDP1 と同様、TkoPolD 溶出画分における絶対分子量の値は 210,000 から 230,000 の間で安定していた。また、最も示唆屈折率の高い溶出画分の TkoPolD の絶対分子量は 211,136 であった (図 2-2 (a))。これらの値は、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出位置から見積もられた分子量 (TkoDP1: 190,000、TkoPolD: 370,000) とは異なっていた。

2.3.3. TkoDP1 アミノ酸配列からの天然変性領域の予測

Thermococcales 目に属する *T. kodakarensis*、*P. horikoshii*、*P. abyssi*、*P. furiosus* の DP1 の N 末端領域のアミノ酸配列と二次構造を比較したところ、TkoDP1 の 60 番目から 247 番目の領

域には特定の構造が見られなかった (図 2-3 (a))。また、その領域は *Pyrococcus* 属のものと比較して長かった。DISOPRED3 を用いた予測では、TkoDP1 の 65 番目から 290 番目の領域が特定の構造をとっていないと予測された (図 2-3 (b))。

2.3.4. TkoDP1 N 末端フラグメントの作製と CD スペクトルの測定

TkoDP1 で、特定の構造をとっていないと予測された領域が、本当に変性領域であるかどうかを調べるために、TkoDP1 の 60 番目から 228 番目までペプチドにヒスチジンタグを付加した His-tagged TkoDP1(60-228) を調製した。His-tagged TkoDP1(60-228) のアミノ酸配列から計算される分子量は 19,435.13 であるが、His-tagged TkoDP1(60-228) は SDS- 12.5% PAGE ではマーカーから見積もると約 30,000 に相当する位置に泳動されていた (図 2-3 (c))。精製した His-tagged TkoDP1(60-228) の CD スペクトルは 200 nm 付近で極小値を示した (図 2-3 (d))。これは特定の構造を持たないタンパク質に見られる特徴であり、His-tagged TkoDP1(60-228) は特定の構造をとっていないことがわかった。

2.3.5. ヌクレオチド取込み活性の測定

TkoPolD の DNA ポリメラーゼ活性をヌクレオチド取込み活性によって測定した (図 2-4、表 2-2)。TkoDP1 および TkoDP2 単独では、ヌクレオチド取込み活性は検出されなかったが、両者を混合した TkoDP1+DP2 では顕著な活性が検出された (図 2-4 (a))。また TkoDP1+DP2 のヌクレオチド取込み活性の強さは、TkoPolD の約 88%であった。次に、一定量の TkoDP1 に対して様々な量比の TkoDP2 を加えた場合、また、その逆の場合のヌクレオチド取込み活性を測定した。(図 2-4 (b), (c))。両者共にもう一方のサブユニットタンパク質の量比が増えるに従ってヌクレオチド取込み活性が上昇し、両者の比が等量になったときに最大の活性を示した。

2.3.6. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の測定

続いて TkoPolD の DNA 基質に対する 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定した (図 2-5)。DNA ポリメラーゼ活性と同様、TkoDP1 および TkoDP2 サブユニット単独では、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は検出されなかったが、両者を混同したときに 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出された。また、再構成された TkoDP1+DP2 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は TkoPolD と同等の強さであった (図 2-5 (a))。また、TkoDP1(D473A H475A) と TkoDP2 を共産生させた変異体 TkoPolD は 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が消失していた。さらに、マグネシウムがなく、さらに 100 mM の EDTA を添加した条件では 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は検出され

なかった (図 2-5 (a))。また、EDTA を添加せずマグネシウムイオンがない条件ではわずかに 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出された (図 2-5 (b))。

また、DNA 基質の構造によって TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の強さがどのように影響されるかを調べるため、ssDNA、dsDNA および primed DNA を基質に用いて 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性測定を行った (図 2-5 (c))。5 nM の ssDNA、dsDNA および primed DNA 基質について様々な濃度の TkoPolD を 20 分間反応させた結果、切断活性は primed DNA が最も高く、次いで dsDNA、ssDNA の順であった。primed DNA に対して、TkoPolD は 5 nM の時にほとんどの基質 DNA を分解していたが、dsDNA に対しては、TkoPolD が 50 nM のときから切断産物のバンドが顕著に見え始めた。ssDNA の場合は dsDNA の場合と同様 TkoPolD の濃度が 50 nM から切断産物が見え始めたが、TkoPolD 濃度が 400 nM の場合でも短い DNA 断片の量は dsDNA の場合に比べて少なかった。また、どの基質 DNA を用いた時でも、10 ヌクレオチドより短い長さの反応産物は検出されなかった (図 2-5 (c))。

二価金属イオンの違いによって切断効率が変化するかどうかを調べた (図 2-6)。ssDNA および primed DNA を基質として用いたいずれの場合でも、二価金属イオンとしてマグネシウムイオンよりもマンガンイオンを用いた方が、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が高かった。また、TkoDP1 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性はマグネシウムイオンを用いた場合は検出されなかったが、マンガンイオンを用いた時はわずかに活性が見られた。またこの活性は、primed DNA よりも ssDNA を基質にしたときの方が強かった。

続いて TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が、実際の細胞内で機能しているかどうかを検証するため、生体内二価金属イオン濃度における TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性について調べた (図 2-7)。マグネシウムイオン濃度が 100 mM の条件では活性は検出されなかったが、マンガンイオン濃度が 0.1 mM の条件では、マグネシウムイオンの場合よりも顕著に強い活性が検出された。実際の生体内を模した 100 mM のマグネシウムイオンと 0.1 mM のマンガンイオンを用いた条件では、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出された。

DNA 複製において 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が機能するのは、DNA のプライマー鎖の 3'末端部分にミスマッチ塩基対が生じた時であると考えられているため、この条件を模倣するために 3'末端にミスマッチ塩基対を持つ DNA 基質を作製し、TkoPolD が生体内二価金属イオンの条件下で 3'末端のミスマッチ塩基対を除去できるかどうかを調べた (図 2-8)。ミスマッチのない基質では活性が低かったが、ミスマッチ塩基対の数が増えるに従って基質 DNA の切断活性の促進が観察された (図 2-8 (a))。ミスマッチのない基質での 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の切断様式を基準として考えると、ミスマッチ塩基対のある基質の場合は、基準となる切断様式がミスマッチ塩基対の数の分だけゲルの下方に移動していた。また、マグネシウムイオン濃度が 2 mM の条件では、ミスマッチ塩基対の有無に関わらず、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の強さに顕著な違いはなかった (図 2-8 (b))。

2.3.7. DNA 結合活性の測定

TkoPolD の DNA 結合活性は、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性と同様の ssDNA、dsDNA および primed DNA を基質に、ゲルシフトアッセイを行うことで評価した (図 2-9)。またシフトしたバンドの割合から、TkoDP2、TkoDP1+DP2 および TkoPolD のそれぞれの基質への結合活性の K_D 値を算出した (表 2-3)。

TkoDP1 は DNA ポリメラーゼ活性およびエキソヌクレアーゼ活性と同様に、単独ではどの基質 DNA に対して安定な DNA 結合活性は示さなかったが、TkoDP2 は単独でも基質 DNA への結合活性を示した。また、TkoDP2 の DNA 結合活性は、primed DNA に対して最も高く (K_D 値: 3.7 ± 0.48 nM)、次いで dsDNA (K_D 値: 9.2 ± 2.3 nM) であった。ssDNA に対しては、シフトバンドがスミアになっており、primed DNA や dsDNA の時と同じ位置に明確なシフトバンドは見られなかったが、TkoDP2 の濃度が 40 nM の時からバンドが上部にシフトし始めた (K_D 値: 70 ± 14 nM)。TkoPolD の DNA 結合活性は、TkoDP2 の場合と同様に primed DNA に対して最も高く (K_D 値: 7.0 ± 0.52 nM)、次いで dsDNA (K_D 値: 16 ± 4.1 nM)であり、ssDNA に対しても同様、シフトバンドがスミアになっており、明確なシフトバンドは見えていないが、タンパク質の濃度が 80 nM の時からバンドが上部にシフトし始めた (K_D 値: 280 ± 91 nM)。再構成した TkoDP1+DP2 の DNA 結合活性の強さは、primed DNA (K_D 値: 16 ± 4.9 nM)、dsDNA (K_D 値: 29 ± 3.1 nM)、ssDNA (K_D 値: 270 ± 65 nM) の順に結合活性が強かった。TkoPolD と TkoDP1+DP2 および TkoDP2 単独いずれの場合も primed DNA に対する結合活性の解離定数は約 10 nM であり、三者の DNA 結合活性の強さに大きな違いはなかった (図 2-9)。

次に TkoPolD の DNA 結合活性が二価金属イオンの濃度に依存するかどうかを調べた (図 2-10)。二価金属イオンが存在しない条件または 2 mM のマグネシウムイオンが存在する条件では、TkoPolD の濃度が 10 nM と 20 nM の間でバンドがゲル上部にシフトした。一方、10 mM マンガンイオンが存在する条件では TkoPolD が 20 nM の時に、タンパク質と結合していない DNA に相当する位置のバンドがなくなり、その上部と下部にバンドが出現した。ゲル上部のバンドは他の条件と同様、タンパク質と結合したものと考えられ、下方のバンドは TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼによって基質 DNA が分解されたために生じたものであると考えられた。

2.3.8. 電子顕微鏡による単粒子解析

TkoPolD の構造情報を得るために、透過型電子顕微鏡による単粒子解析を試みた。酢酸ウラニルによる負染色法による単粒子解析では、取得した 17,140 個の粒子の投影像を、200 のクラスに分け平均化した像を得られた (図 2-11 (a))。得られた 200 クラスの平均像のほとん

どで同じような構造が観察され、また、得られた投影像からは明らかな対称性は見られなかった。クライオ電子顕微鏡法による単粒子解析では、7,354 個の粒子を 25 のグループに分類し、平均化した投影像が作製され、透過型電子顕微鏡と同様の二次元投影像が観察された (図 2-11 (b))。

両方法で観察された TkoPoID の構造はよく似ており、「アヒル」のような形をしていた。大きさはおよそ $120 \times 120 \text{ \AA}$ であった (図 2-12 (a) (b))。得られた投影像と PabDP1 および PabDP2 の部分構造を比較したところ、アヒルの頭の部分に小サブユニットが、胴体の部分に大サブユニットが一致した。これを元に推定構造モデルを計算した (図 2-12 (c))。また、作製した推定構造モデルから計算された投影像は、電子顕微鏡で観察された投影像と非常に似ていた (図 2-12 (d))。

2.4. 考察

2.4.1. 多量体構造

TkoDP1、TkoDP2 および TkoPolD 全てのタンパク質が単一のピークで溶出された (図 2-1 (a), (b), (d)) ことから、本研究で用いたタンパク質は均一な構造であることが示唆された。また、TkoDP1+DP2 が TkoPolD と同じ溶出位置に単一のピークで溶出されたこと、および、溶出ピークの面積から算出した再構成率が 93%であったことから、TkoDP1 と TkoDP2 が試験管内で速やかに過不足なく複合体を形成され、その複合体の構造が TkoPolD と同様であることが示唆された (図 2-1 (c))。

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出体積から計算された各タンパク質の分子量は、TkoDP1 は 190,000、TkoDP2 は 170,000、TkoDP1+DP2 および TkoPolD は 370,000 であり、それぞれアミノ酸配列から計算された分子量の約 2.3 倍、1.1 倍、1.6 倍であった。これらの結果より各タンパク質の溶液中での多量体構造の推定を試みた。TkoDP1 は、計算値から単純に考えるとホモ二量体である。しかし、TkoDP1 の N 末端側には天然変性領域と考えられる領域があると予測されており、実際に 60 番目から 228 番目の領域を産生させ、CD スペクトルを測定した結果から、特別な構造を有していなかった (図 2-3)。天然変性領域を含むタンパク質はストークス半径が理想的な球形タンパク質よりも大きくなるため、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーでは実際の分子量よりも早く溶出される (Uversky, 2012)。従って、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーから見積もられた TkoDP1 の分子量はアミノ酸配列から計算される分子量よりも大きくなり、実際の分子量を反映していないと推測した。従って、この結果からのみでは TkoDP1 の溶液中での多量体構造を同定するのは難しいと考えられた。一方、TkoDP2 は見かけの分子量とアミノ酸配列から計算される分子量の値が近いことから、溶液中で単量体であることが示唆された。TkoPolD についても TkoDP1 と同様、単純に考えるとゲルろ過カラムクロマトグラフィーの結果のみでは TkoPolD は二分子の TkoDP1 と一分子の TkoDP2 が結合したヘテロ三量体となる (TkoDP1: 190,000 + TkoDP2: 170,000 = 350,000) が、TkoDP1 の天然変性領域を考慮すると TkoPolD の多量体構造もこの結果のみでは決定することは出来ないと考えた。

以上の理由より、TkoDP1 および TkoPolD の多量体構造を同定するためには、タンパク質の形に影響を受けにくい手法により分子量を測定しなければならない。従って、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーと静的光散乱を接続した系を用いて絶対分子量を測定し、TkoDP1 および TkoPolD 複合体の構成比の同定を試みた。

天然変性領域を含むタンパク質やカラム樹脂と比特異的な相互作用を有するタンパク質は、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出体積が分子量を反映した溶出体積とずれてしまうが、このような場合でも静的光散乱法を用いれば実際の分子量に反映した結果を得られた例

が報告されている (Bourdeau et al., 2009; Gast and Fiedler, 2012; Uversky, 2012)。静的光散乱による絶対分子量の決定は溶液が希薄であるときという条件がある。本研究ではゲルろ過カラムから溶出された試料の濃度範囲は 100–500 $\mu\text{g/ml}$ であったが、このことから希薄な条件で測定できたといえる。TkoDP1 および TkoPolD の絶対分子量を静的光散乱により測定するとそれぞれ約 73,000 および 210,000 であった。また、TkoDP1 および TkoPolD のゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出位置における絶対分子量の測定値は一定の値を示していたことから、溶出時のタンパク質は均一な構造をとっていることが示唆された (図 2-2)。静的光散乱から求められた絶対分子量は、TkoDP1 は、そのアミノ酸配列から計算される分子量 (80,784.2)、TkoPolD は TkoDP1 と TkoDP2 が一分子ずつ結合したときの分子量 (230,962.6) と誤差が 10% 以内であった。静的光散乱を用いた天然変性タンパク質の散乱光強度は、タンパク質分子の高次構造によってある程度の誤差を含んでいるが、その誤差は 10% 以内に収まることが報告されている (Uversky, 2012)。光散乱は散乱光の強度から分子量を算出するため、今回の測定された TkoDP1 および TkoPolD の絶対分子量が誤差 10% 以内であったことは信頼できるデータであると考えている。静的光散乱を用いた分子量測定方法において、Rayleigh の方程式より求められる絶対分子量は、分子の根平均二乗慣性半径に依存し、分子の構造による影響が小さい。従って、静的光散乱ではゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出体積を基にした分子量測定よりも信頼性の高い結果が得られると考えられる。以上のことから、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出体積から算出した分子量よりも、静的光散乱により算出した絶対分子量的の方が実際の溶液中の複合体の構造を反映していると考えられる。従って、溶液中の TkoDP1 および TkoPolD は、TkoDP1 は単量体、TkoPolD は一分子の TkoDP1 と一分子の TkoDP2 から構成されるヘテロ二量体であると決定した。

ファミリーD DNA ポリメラーゼの多量体構造についてはこれまで議論されてきた。*P. furiosus*、*P. abyssi*、*Thermococcus* sp. 9°N のファミリーD DNA ポリメラーゼはヘテロ二量体であると報告されている (Greenough et al., 2014; Gueguen et al., 2001; Ishino et al., 1998; Uemori et al., 1997)。一方、*P. horikoshii* では、PhoPolD の高次構造について、二分子の小サブユニットと二分子の大サブユニットが結合したヘテロ四量体 ($\text{PhoDP1} \times 2 + \text{PhoDP2} \times 2$) であると報告されている (Matsui et al., 2011, 2013; Shen et al., 2001)。しかし、この結果はゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって分析されたものであり、先に述べたように天然変性領域を有するタンパク質の多量体構造をこの方法で決定することは難しい。本研究では TkoPolD の多量体構造を、分子構造の影響が少ない静的光散乱によって複合体の絶対分子量を測定することによって同定を試みた。その結果、TkoDP1 の N 末端にある天然変性領域に影響を受けることなくアミノ酸配列から計算される分子量と同様の測定値を得ることができた。以上より、少なくとも TkoPolD は溶液中でヘテロ二量体の構造をとっていることが強く示唆された。Thermococcales 目のファミリーD DNA ポリメラーゼの多量体構造については、N 末端側の天

然変性領域のため正確な決定が困難であったが、本研究と同様の手法を用いることにより、ファミリーD DNA ポリメラーゼの多量体構造が決定できるだろう。

2.4.2. ポリメラーゼ活性

TkoDP1 および TkoDP2 のサブユニット単独では、ヌクレオチド取込み活性は検出されなかった。また、TkoDP1+DP2 および TkoPolD では顕著なヌクレオチド取込み活性が検出された (図 2-4 (a)、表 2-2)。TkoDP2 は単独でも強い DNA 結合活性を有している (図 2-9) が、単独ではヌクレオチド取込み活性が検出されず、TkoDP1 と複合体を形成して初めてヌクレオチド取込み活性が検出されたことから、TkoDP2 がヌクレオチド取込み活性を発揮するためには、TkoDP1 結合することによる TkoDP2 の構造変化が必要であることを示唆された。また TkoDP1+DP2 のヌクレオチド取込み活性の強さは、TkoPolD の約 88%であったが、これはゲルろ過クロマトグラフィーの結果から見積もられた TkoDP1+DP2 の再構成比とほぼ一致していた。TkoDP1+DP2 と TkoPolD との比活性の差について、組換えタンパク質の濃度定量時の誤差が大きく影響していることと、ヌクレオチド取込み活性の測定結果の振れ幅が大きく、細かな差を議論することができないこと、TkoDP1+DP2 の再構成比と活性の強さの割合がほぼ一致していることを考慮して、再構成した TkoDP1+DP2 と TkoPolD の比活性に大きな差は無いと考えている。今回の条件で算出された TkoPolD の比活性は約 13,000 unit/nmol であった。TkoPolD と並行して、同じ反応液組成、同じ温度で測定した PfuPolB の比活性は 10,000 unit/nmol、TkoPolB の比活性は 22,000 unit/nmol であった (表 2-2)。PfuPolB は PCR 用の酵素として用いられているポリメラーゼであり、高いポリメラーゼ活性を有している。TkoPolD の比活性の値は、PfuPolB と同程度であることから、TkoPolD も PCR 酵素と同等の強いポリメラーゼ活性を持っている酵素であるといえる。このように強いポリメラーゼ活性を持っていることから、*T. kodakarensis* の *polB* 遺伝子欠損株では TkoPolD がリーディング鎖とラギング鎖の両方を合成しているというモデルは理に適っているといえる。また、今回の実験の条件においては、TkoPolD と TkoPolB の比活性を比較した場合、TkoPolB の方が TkoPolD よりも約 1.7 倍大きかった。過去に著者の研究室では、TkoPolD の精製方法が異なるものの、TkoPolD と TkoPolB 両者のプライマー伸長活性を比較し、TkoPolB の方が TkoPolD よりも活性が強かったことを報告している (Kuba et al., 2012)。比活性においても TkoPolB の方が TkoPolD よりも活性が強かったことと併せて考えると、TkoPolB は TkoPolD よりも強いポリメラーゼ活性を有しているといえる。

他の種由来のファミリーD DNA ポリメラーゼと比較する。サブユニット単独でのポリメラーゼ活性について、*P. furiosus*、*P. abyssi*、*P. horikoshii*、*A. fulgidus*、*M. jannaschii* および *Thermococcus* sp. 9°N で研究されている (Abellón-Ruiz et al., 2016; Greenough et al., 2014; Ishino et al., 1998; Sauguet et al., 2016; Shen et al., 2004a; Uemori et al., 1997)。いずれの種においても小

サブユニット単独でのポリメラーゼ活性は報告されていないが、大サブユニット単独でのポリメラーゼ活性についての結果は種によって結果が異なっている。*P. abyssi* のファミリーD DNA ポリメラーゼの研究において、PabDP2 の C 末欠損変異体 PabDP2(1-1061) は、単独でもプライマー伸長活性が検出された (Sauguet et al., 2016)。しかし、PabDP1 と PabDP2 の複合体である PabPolD のプライマー伸長活性は、100 ng (2.8 nM) のプライマーテンプレート M13mp18 ssDNA に対し、13 nM の PabPolD を 55°C で 30 分間反応させた条件で 4000 塩基の伸長産物が検出されている (Henneke et al., 2005) ことに對し、PabDP2(1-1061) 単独でポリメラーゼ活性が検出された条件は、50 nM のプライマーテンプレート DNA (24 mer/60 mer) に対し、酵素濃度が 500–1000 倍過剰である 25–50 μ M の PabDP2(1-1061) を加えて、55°C でプライマー伸長反応を行っており、この条件で 10 分間反応を進行させても基質 DNA の全てが最大長まで伸長されていない (Sauguet et al., 2016)。PabDP2(1-1061) 単独では、酵素を過剰に添加した条件でも PabPolD のポリメラーゼ活性と比較して非常に低いことから、PabDP2(1-1061) 単独のポリメラーゼ活性は顕著に低いと考えている。*P. horikoshii* についても、PhoDP2 も単独でプライマー伸長活性を示しているが、テンプレート鎖の末端部分まで伸長した産物の割合は、同条件で PhoPolD を用いて伸長させた産物と比較して少ない (Shen et al., 2004a) が、PhoDP2 単独でのプライマー伸長活性は、他の種の大サブユニット単独のプライマー伸長活性と比較すると強いかもしれない。しかし、PhoDP2 が PhoDP1 と複合体を形成した時の活性は、PhoDP2 単独の時と比較して顕著に強いことは他の種と同様である。*A. fulgidus* については、AfuDP2 単独でもプライマー伸長活性は検出されているものの、AfuPolD 複合体と比較すると活性は低い (Abellón-Ruiz et al., 2016)。*Thermococcus* sp. 9°N については、論文で直接データは示されていないが、大サブユニット単独ではポリメラーゼ活性がなかったことが報告されている (Greenough et al., 2014)。*M. jannaschii* では、MjaDP2 を産生した大腸菌の熱処理後の粗細胞抽出液で調べられており、活性が検出されなかった (Ishino et al., 1998)。ファミリーD DNA ポリメラーゼ複合体については、*P. furiosus*、*P. abyssi*、*P. horikoshii*、*Thermococcus* sp. 9°N で比活性が調べられている (Greenough et al., 2014; Gueguen et al., 2001; Henneke et al., 2005; Ishino and Ishino, 2001; Shen et al., 2001; Uemori et al., 1997)。それぞれの種ごとに各研究グループがそれぞれの手法で比活性を測定している。しかし、比活性の値は反応溶液組成や測定温度や検出方法の条件、基質 DNA の種類や作製方法によって大きく変化するため、各種間でのヌクレオチド取込み量の測定値を数字のみで直接比較することはできない。一方、同じファミリーD DNA ポリメラーゼで二通りの方法で比活性を測定している報告がある。比活性測定に用いる基質 DNA には主に二種類あり、活性化 DNA または M13 ファージ由来の ssDNA が用いられている。PfuPolD と PabPolD では両方の基質 DNA で比活性が調べられているが、両者ともに M13 ファージ由来 ssDNA を基質に用いた方が比活性の値が高い (Gueguen et al., 2001; Uemori et al., 1997)。PfuPolD は PfuPolB と異なり、RNA プライマーからもプライマー伸長反応を進行させることができたと報告されている (Uemori et al., 1997)。基質 DNA の種類に

より活性に差が生じるのは、基質によって同じヌクレオチドの取り込みでも測定している反応の種類が異なることがその原因であると考えられる。活性化 DNA を用いた場合は、「歯抜け」した DNA 鎖の隙間を埋める反応を検出しており、これは損傷 DNA の修復に近い活性である。一方、M13 ファージ ssDNA を用いた場合は、プライマーからの伸長反応を検出しているため、DNA 複製に近い反応である。PfuPolD や PabPolD において、M13 ファージ ssDNA を用いたプライマー伸長反応の方が比活性の値が高いことは、ファミリーD DNA ポリメラーゼが複製に適したポリメラーゼ活性を有していることを示唆している。また、PfuPolD が RNA プライマーから伸長反応が開始できたこともその可能性を支持している (Uemori et al., 1997)。TkoPolD と TkoPolB について、本研究では TkoPolD について、M13 ファージ由来 ssDNA を用いた比活性の測定やプライマー伸長活性を測定していないが、TkoPolD も活性化 DNA よりも M13 ファージ ssDNA を用いた方が比活性の値が高くなる可能性が予想される。

TkoDP1 と TkoDP2 は、両者共にもう一方のサブユニットタンパク質の量比が増えるに従ってヌクレオチド取込み活性が上昇し、両者の比が等量になったときに最大の活性を示したことから、TkoDP1 と TkoDP2 は 1 : 1 の量比で複合体を形成しているという静的光散乱での結果がヌクレオチド取込み活性の側面からも支持された。また、その後はヌクレオチド取込み活性が横ばいになったことから、余剰のサブユニットが取込み活性を阻害することはなかったと考えられる。このことより、TkoDP1 と TkoDP2 は試験管内で速やかに再構成が行われ、正しい立体構造を形成することが示唆された。*Pyrococcus* 属と *Thermococcus* 属では小サブユニットと大サブユニットの遺伝子が隣り合わせに存在し、複製起点の下流にオペロンを形成していることが報告されている (Myllykallio et al., 2000; Uemori et al., 1997)。また、*P. furiosus* では PfuPolD とオペロンを構成しているタンパク質の一つである RadB と PfuDP1 が相互作用することが報告されていることから、実際に細胞内でもこのオペロンが機能している可能性が高い (Hayashi et al., 1999)。同様に *T. kodakarensis* のゲノム上でも *dp1* 遺伝子と *dp2* 遺伝子は隣接しており、オペロンを形成していると考えられている。実際に細胞内でこれらの遺伝子が転写されてタンパク質に翻訳されたとき、TkoDP1 と TkoDP2 は速やかに再構成され、正しい立体構造をとり、複製ポリメラーゼとして機能するものと考えられる。TkoDP1 と TkoDP2 の強い相互作用は DNA 複製ポリメラーゼとして機能するためには必須の性状なのかもしれない。

ファミリーD DNA ポリメラーゼのポリメラーゼ活性について争点となるのが、大サブユニット単独でポリメラーゼ活性があるのかどうか、という議論である。この議論の肝心は、「活性がある」ということの定義であり、わずかでも活性があれば「活性がある」と定義するのか、ファミリーD DNA ポリメラーゼ複合体と比較して「活性がある」と定義するのかで結論が異なってくる。PhoDP2、PabDP2(1-1050)、AfuDP2 は単独でポリメラーゼ活性が検出された。活性の強さにばらつきがあるものの、これらの実験系は primed DNA からの数十塩基の

伸長活性であり、M13 ファージ由来 ssDNA を用いた実験系のような数千塩基を超えるような長鎖 DNA の合成ではない。また、活性化 DNA へのヌクレオチド取込み活性でもなかった。先述したように、ファミリーD DNA ポリメラーゼはプライマー伸長反応の方がより活性が強い可能性がある。先の三種のアーキア由来の大サブユニットが単独で活性が検出されたのは、より活性の検出しやすいプライマー伸長反応の系で比活性を測定していたことが要因の一つだと推測した。また、PabDP2(1-1050)のように、反応系に酵素を過剰量添加している条件で行っているものは、非特異的な反応により酵素本来の活性を検出していない可能性が高い。本研究では、TkoDP2 単独を高濃度添加した条件でのプライマー伸長反応の測定は行っていないが、上記の条件では TkoDP2 単独でも数～数十塩基程度の伸長反応が検出できるかもしれない。しかし、仮にこの条件で活性が検出されたとしても、TkoDP2 の性質として単独でもポリメラーゼ活性があると決定することには疑問を禁じ得ない。PhoDP2 と PabDP2 は単独で活性がわずかにあるものの、それぞれ PhoPolD と PabPolD のポリメラーゼ活性の強さと比較すれば顕著に弱いことは先に述べた通りであり、これらの弱い活性は、実は非特異的な活性を検出しているのではないだろうか。

以上の理由から、著者は、ファミリーD DNA ポリメラーゼ複合体でのポリメラーゼ活性より著しく低い場合は、大サブユニット単独での活性は「ない」と考えており、「複合体を形成して大サブユニットの構造に変化が生じることで初めて強いポリメラーゼ活性を示す」というのがファミリーD DNA ポリメラーゼのポリメラーゼ活性についての最大の特徴であると考えている。

2.4.3. 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性

ヌクレオチド取込み活性と同様、TkoDP1 および TkoDP2 のサブユニット単独では 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は検出されなかった。小サブユニットにはホスホジエステラーゼドメインが保存されており、ファミリーD DNA ポリメラーゼの 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性機能に関与すると考えられている (Aravind and Koonin, 1998)。二価金属イオンにマグネシウムイオンを用いた条件では、TkoDP1 および TkoDP2 単独では 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されなかったが、TkoDP1 と TkoDP2 の両者を混同したときに 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されたことは、ヌクレオチド取込み活性と同様の特徴であった。また、TkoDP1+DP2 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は TkoPolD と同等の強さであったことから、試験管内再構成系でも TkoPolD と同様の高次構造に再構成されたことを支持している。また、変異体 TkoPolD は、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示さなかったことから、PhoDP1 で必須であったアミノ酸残基は TkoDP1 でも重要であることが示唆された (図 2-5 (a))。マグネシウムイオンを含まない反応溶液で EDTA を添加しない条件では、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されたことから、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に対する、タンパク質溶液から反応溶液系に持ち込

まれた二価金属イオンの影響を検出された (図 2-5 (b))。TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に対する反応液中の二価金属イオンの純粋な影響を考えるときには、タンパク質溶液から持ち込まれた二価金属イオンについて考慮しなければならない。TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性について、反応溶液中に二価金属イオンを含む条件で顕著な活性が検出され、含まない条件では弱い活性が検出され、含まない条件にさらに EDTA を添加して二価金属イオンを完全にキレートした条件では活性は検出されなかったこと。このことから、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は二価金属イオンに依存していることが示唆された。

TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、基質 DNA の構造によって影響を受けたが、その活性は primed DNA が最も強く、次いで dsDNA、ssDNA の順であった (図 2-5 (c))。これらの様々な基質 DNA に対する TkoPolD の DNA 切断効率の差は、TkoPolD と DNA 基質の結合活性の差と同様の傾向が見られた (図 2-9)。すなわち、TkoPolD は primed DNA、dsDNA、ssDNA の順に強く DNA に結合していたが、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の強さも primed DNA、dsDNA、ssDNA DNA の順に強かったことから、TkoPolD の DNA への安定な結合が 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に影響していることが示唆している。また、検出された反応産物の長さは 10 ヌクレオチドよりも長く、それ以下の長さのものは検出されなかったことから、TkoPolD が DNA と安定に結合することのできるプライマー鎖の最短の長さが 10 ヌクレオチドであることが示唆された。すなわち、10 ヌクレオチド以上の長さがあれば TkoPolD は DNA に安定に結合することができると示唆された。

また、TkoDP1 および TkoPolD 共にマンガンイオンを用いた場合の方が強い 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出された (図 2-6)。 *P. horikoshii* では、PhoDP1 単独の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、マグネシウムイオンでは検出されないが、マグネシウムイオンの代わりにマンガンイオンを用いた場合には 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されている (Shen et al., 2004a)。TkoDP1 も *P. horikoshii* の時と同様、マンガンイオンを用いた条件で 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出された。TkoDP1 と TkoPolD の活性の強さの差について、本実験系では、TkoPolD は 10 nM の濃度であるが TkoDP1 はその 300 倍の 3 μ M と高い濃度で実験を行っており、これは基質 DNA の濃度の 600 倍である。しかし、この条件でも TkoDP1 と TkoPolD が基質 DNA のを分解する度合いは同程度であった。この理由として、TkoDP1 の DNA 結合活性が低いことが推測される (図 2-9)。TkoDP1 は DNA 結合能がほとんどないため、過剰な TkoDP1 を加えて TkoDP1 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性部位と DNA とが接触する機会を増やしないと 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が働かないのだろう。言い換えれば、TkoPolD が顕著に 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示すのは、TkoDP2 が DNA と結合することで、TkoDP2 が DNA の 3'末端側を TkoDP1 の活性部位付近に固定し、TkoDP1 と DNA が接触しやすくなるために顕著な活性が検出されたといえる。従って、TkoDP1 の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活

性は、TkoDP2 と複合体を形成することによる TkoDP1 の構造の変化の影響もあるだろうが、基質 DNA の 3'末端との安定な相互作用の方が重要ではないのだろうかと推測した。

TkoPolD は、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の基質として ssDNA よりも primed DNA を用いたときにより強い活性が検出されることは上述したが (図 2-5 (b))、TkoDP1 単独の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性については、ssDNA の方が primed DNA よりも強い活性が検出された (図 2-6)。この理由として、基質 DNA の形状が関係していると考えられる。ssDNA の場合は、TkoDP1 は 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が機能する 3'端部分にどの方向からも接近することができる一方、primed DNA の場合は鋳型鎖が邪魔をして 3'端に接近できる方向が限られてくる。そのために ssDNA の方が TkoDP1 と接触する機会が多くなったため、primed DNA より 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性により分解される基質 DNA の量が多くなったのだと推測された。この結果からも TkoDP1 の活性部位と基質 DNA の接触頻度が活性に影響を与えていることが示唆される。

TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼの強さは、基質 DNA への結合と二価金属イオンの二つの要素に影響を受けている。しかし、TkoPolD の DNA への結合活性は、二価金属イオンに依存しない (図 2-10) ことから、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に対して DNA 結合と二価金属イオンが影響を与える機構は独立していると考えられる。すなわち、TkoPolD の基質 DNA への結合は、基質の構造によって影響を受けており、二価金属イオンによる影響はない。そして、TkoPolD が基質 DNA へと結合した後、TkoPolD が 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を発揮するときに、活性部位の触媒効率が金属イオンの種類によって影響を受けるのだと予想している。二価金属イオンが DNA ポリメラーゼの 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に与える影響については多く研究がなされており、一般的にマンガンイオンのほうがマグネシウムイオンよりも活性が高くなる傾向にある (reviewd in Vashishtha et al., 2016)。その理由としては、隣接する酸素原子リガンドとの配位結合の距離の違いにより、マンガンイオンの方がマグネシウムイオンよりもリガンドに接近しやすくなるため、触媒活性が高くなるのだと考えられている (Harding, 2006; Vashishtha et al., 2016; Xia et al., 2011)。TkoPolD も同様の理由でマンガンイオンを用いた条件の方が 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が促進されたと推測している。

他の種由来のファミリー D DNA ポリメラーゼの 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、*P. furiosus*、*P. horikoshii*、*P. abyssi*、*Thermococcus* sp. 9°N および *M. jannaschii* で報告されている。PfuPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、基質に ssDNA および primed DNA、二価金属イオンにマグネシウムイオンを用いた条件で測定されているが、primed DNA よりも ssDNA の方がより活性が強いことが報告されている。*P. horikoshii* では PhoDP1 単独および PhoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性について調べられている (Shen et al., 2001, 2003, 2004a, 2004b)。PhoDP1 はマグネシウムイオン存在下ではほとんど 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は見られないが、マンガンイオン存在下では活性が検出されたことが報告されている。また、PhoPolD はマグネ

シウムイオンおよびマンガンイオンの両方で活性が検出されているが、マグネシウムイオンよりもマンガンイオンを用いた条件でより高い活性が報告されている (Shen et al., 2004a)。PabPolD も、他の種と同様に 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有していることが報告されている (Gueguen et al., 2001)。また、二価金属イオンにマグネシウムイオンの代わりにカルシウムイオンを用いた条件でも 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を調べており、PabPolD はカルシウムイオンの条件でも切断活性があった (Ralec et al., 2017)。PabDP1 単独の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性については、PabDP1 全長での活性の報告は無いが、PabDP1 の N 末端欠失変異体である PabDP1(144-622) について、二価金属イオンにマグネシウムイオンを用いた場合でも、DP1 単独で 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性があることが報告されている (Sauguet et al., 2016)。マグネシウムイオンで活性が検出されたことは TkoDP1 を含む他の小サブユニットの性質と矛盾するように見える。しかし、PabDP1(144-622) の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性測定の方法は、弱い活性が検出できるような条件で実験を行っている。その条件は、ポリメラーゼの校正機能が働く時の基質を模した 3'末端側に 4 mer のミスマッチ配列を含むプライマーテンプレート DNA (23 mer match + 4 mer mismatch/60 mer) を使用し、基質 DNA の濃度 (50 nM) よりも 200 倍高い濃度のタンパク質 (10 μ M) を添加して反応を行っている。基質 DNA に対する工夫と過剰量のタンパク質のため、マグネシウムイオンを用いた場合でも活性が見られたと考察した。*Thermococcus* sp. 9 $^{\circ}$ N では、小サブユニット単独では 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性はなく、9 $^{\circ}$ N PolD で活性が検出されたと報告されている (Greenough et al., 2014)。MjaPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性については、MjaDP1、MjaDP2 それぞれ単独の場合と MjaPolD について調べられている (Ishino et al., 1998; Jokela et al., 2004)。MjaDP1 と MjaDP2 を単独または共産生させた大腸菌の全細胞粗抽出液を用いてマグネシウムイオン存在下で 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を調べたところ、各サブユニット単独では活性は検出されなかったが、両者を混合した場合のみ活性が検出された (Ishino et al., 1998)。MjaDP1 単独の場合については精製された組換えタンパク質での結果が報告されている。二価金属イオンにマンガンイオンを用いて活性測定を行った結果、ssDNA および primed DNA において切断活性が見られている。また、3'末端側にミスマッチ配列を含む primed DNA (23 mer match + 1 or 4 mer mismatch/60 mer) を用いて切断活性を測定した場合、ミスマッチを含まない primed DNA よりも活性が高かった (Jokela et al., 2004)。

TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性について他の種と比較する。TkoDP1 単独では 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が極めて低く、マンガンイオンを用いて過剰量のタンパク質を添加して初めて活性が検出できるという点で共通している。TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性について、切断様式は 1 ヌクレオチドずつ切断した「梯子状」にバンドが検出されているが、これは *P. furiosus* (Ishino and Ishino, 2006, 2001)、*P. abyssi* (Ralec et al., 2017; Sauguet et al., 2016)、*P. horikoshii* (Shen et al., 2001)、*Thermococcus* sp. 9 $^{\circ}$ N (Greenough et al., 2014)、*M. jannaschii* (Jokela et al., 2004) で報告されている結果と同様である。TkoPolD の活性の強さに

については基質の濃度や構造、二価金属イオンの種類などの反応溶液の組成、検出方法がそれぞれ異なることから単純に比較はできないが、用いている酵素の量と基質の量が概ね同じ量であり、反応産物のバンドのパターンも同じ様子であることから TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の強さは他の種由来のファミリーD DNA ポリメラーゼと大きく変わらないと考えている。

ポリメラーゼ活性のときと同様、ファミリーD DNA ポリメラーゼについての重要な議論に、小サブユニット単独で 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性があるのかどうかを議論していきたい。上述のように、TkoDP1 は、マンガンイオンを含む反応系で過剰量の酵素を用いた場合にわずかに 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出された。他の種由来の小サブユニットについても、反応系にマンガンイオンを含んでいるものは活性が検出されており (Jokela et al., 2004; Sauguet et al., 2016; Shen et al., 2004a)、活性がないと報告されているものはいずれもマグネシウムイオンを用いた場合であった (Greenough et al., 2014; Ishino et al., 1998)。すなわち、小サブユニット単独で 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されなかった種も、二価金属イオンにマンガンイオンを用いれば活性が検出される可能性がある。本研究結果から TkoDP1 は小サブユニットは単独での DNA 結合活性は検出されなかった (図 2-9) ことを考えると、ファミリーD DNA ポリメラーゼの小サブユニットは単独でもエキソヌクレアーゼ活性を持っているが、DNA との相互作用がないために活性が検出できないのではないかと考えられた。マンガンイオン存在下で活性が検出された理由は、安定に DNA と結合できないため、触媒効率のいいマンガンイオンの時に初めて DNA の 3'末端側を切断する活性を働いたのではないかと予想した。TkoDP1 が TkoDP2 と複合体を形成して顕著な活性が検出されるのは、複合体形成による TkoDP1 の構造変化よりも、TkoDP2 による基質 DNA の 3'末端と TkoDP1 の触媒活性部位の接近が重要なのではないだろうか。

DNA ポリメラーゼは、ポリメラーゼ活性が働くときと 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が働くときの構造に違いがあることがわかっており、それぞれの構造の切り替えについて、ファミリーB DNA ポリメラーゼの構造解析からその構造変化について詳細について調べられている (Franklin et al., 2001; Ganai et al., 2015; Nishida et al., 2009)。3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を検出する反応系では、反応溶液に dNTP を含まない条件で活性を検出している。このとき DNA ポリメラーゼは、ポリメラーゼモードから構造が傾くことで 3'-5'エキソヌクレアーゼモードの構造へと変化する。この時、プライマー鎖の 3'末端は DNA ポリメラーゼの 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性部位へと導かれる。TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性についての上の考察は、TkoPolD にもポリメラーゼモードと 3'-5'エキソヌクレアーゼモードの切り替え機構が保存されていることを強く示唆しているのではないだろうか。

アーキア、真正細菌、真核生物すべての生物において、複製 DNA ポリメラーゼが有している 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、DNA 複製の途中にミスマッチ塩基対が誤って挿入されたときに校正機能として作用することで DNA 複製の正確性の向上に寄与していると考えられている (Ishino and Ishino, 2012; Pavlov and Shcherbakova, 2010; Pomerantz and O'Donnell, 2007)。DNA ポリメラーゼは、DNA 合成の時にはポリメラーゼモードの構造になっているが、間違った塩基が取り込まれたときには構造が変化し 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が働くと予想される。そこで、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が実際の細胞内でどのように機能しているか調べるために、細胞内の二価金属イオン濃度を模した条件で 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定したところ、TkoPolD は細胞内の二価金属イオン濃度で 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有することがわかった (図 2-7)。また、プライマー鎖の 3'末端部分をミスマッチ塩基対にした場合には、そのミスマッチ塩基対の数に対応して 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が強くなった (図 2-8)。この結果より、*T. kodakarensis* の細胞内において、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、DNA 複製の際に複製エラーによってミスマッチ塩基対が生じた場合に活性が発揮され、ミスマッチ塩基が除去されることが示唆された。すなわち、TkoPolD は *T. kodakarensis* の細胞内において校正ポリメラーゼとして機能していると考えられる。プライマー鎖の 3'末端にミスマッチ塩基対の数が増えるごとに活性が強くなることは MjaDP1 でも報告されている (Jokela et al., 2004)。また、先に述べたように PabDP1(144-622) では Jokela らの報告をもとに基質 DNA の設計段階で 3'末端にミスマッチ塩基対を作り、活性を強めて検出できるように工夫している (Sauguet et al., 2016)。これらの報告では、二価金属イオンの濃度は細胞内を模したのではなく、活性を検出しやすくするために至適の濃度のマンガンイオンまたはマグネシウムイオンを用いているため、ファミリー D DNA ポリメラーゼの校正機能について検証するものではなかった。本研究により、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が細胞内の金属イオン濃度においても機能的に働いていることが明らかになった。

2.4.4. DNA 結合活性

TkoPolD の DNA 結合活性は、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性と同様の ssDNA、dsDNA および primed DNA を基質に用いてゲルシフトアッセイを行うことで評価した (図 2-9)。TkoDP1 はポリメラーゼ活性および 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性と同様に、全ての DNA 基質に対して DNA 結合活性は示さなかったが、TkoDP2 は単独でも DNA への結合活性を示した。また、これらの結合活性は、primed DNA に対して最も高く、次いで dsDNA であり、ssDNA に対して相互作用はしているものの安定な結合をしていると考えられるシフトバンドは見られなかった。TkoPolD および TkoDP1+DP2 の DNA 結合活性も、TkoDP2 の場合と同様に primed DNA に対して最も高く、次いで dsDNA であり、ssDNA に対しては安定な結合は見られなかった。結合の割合から解離定数を算出すると、TkoPolD よりも TkoDP2 単独の場合の方が DNA 結合

活性は強かった (表 2-3)。この理由として、TkoDP2 に TkoDP1 が結合することで TkoDP2 に構造変化が生じることや、TkoDP2 の DNA 結合部位と TkoDP1 の結合部位が重複しており、TkoDP1 が TkoDP2 の DNA 結合の障害となっていること、TkoDP2 の DNA との結合部位が、TkoDP1 がいないために露出しており DNA に接触しやすいことなどが考えられる。

他の種由来のファミリーD DNAポリメラーゼのDNA結合活性は、*P. abyssi*と*P. horikoshii*について報告されている。PabPolDのDNA結合活性は、異なる条件で測定されたものが四つ報告されている。最初に報告されたのは、25°Cにおいて、25 nMのprimed DNA (48 mer/75 mer) に対するPabPolDのDNA結合活性をアガロースゲル電気泳動でシフトバンドを検出した実験で、この時、PabPolDの濃度が500 nMの時に完全にシフトしたバンドが検出された。また、シフトしたPabPolD-DNA複合体に対して、様々な基質DNAを競合させる実験を行ったところ、dsDNA (75 mer/75 mer) とDNAプライマーテンプレートDNA (48 mer DNA/78 mer DNA) およびRNAプライマーテンプレートDNA (48 mer RNA/75 mer DNA) を2.5倍量以上、ssDNAを12.5倍量以上加えた条件でシフトバンドが消失したことから、PabPolDはssDNAよりもdsDNAおよびprimed DNAに対して強い結合活性を有していることが報告されている (Henneke et al., 2005)。また、二番目の報告では、125 nMのprimed DNA (32 mer/87 mer) を用いて、60°Cの条件でDNA結合活性を測定している。この条件では、はっきりとしたシフトバンドは見えていないが、250 nMから500 nMの間でPabPolD-DNA複合体と考えられるバンドのシフトが見られている (Castrec et al., 2010)。三番目は、25°Cにおいて、SPR法を用いてprimed DNAとの結合活性が測定されており、この場合の K_D 値は56 nMと報告されている (Castrec et al., 2010)。四番目は蛍光偏光測定法によってPabPolDとDNAとの結合活性を測定している。PabPolDとssDNA (40 mer) および、プライマー部分の長さが異なるprimed DNA (33 mer/40 mer, 31 mer/40 mer, 28 mer/40 mer, 22 mer/40 mer) との K_D 値は、6–10 nMの範囲であった。一方、dsDNA (40 mer/40 mer) との K_D 値は約28 nMであった (Richardson et al., 2013)。PabPolDは、ゲルシフトアッセイではssDNAよりもdsDNAの方がDNA結合活性は強かったが、蛍光異方測定法ではssDNAの方が強い結合活性を示している。報告されているPabPolDのDNA結合活性についてまとめると、基質にはssDNAおよびdsDNAよりもprimed DNAを好み、結合活性の強さを示す K_D 値は、ゲルシフトアッセイでは250–500 nM、SPR法では56 nM、蛍光異方測定では10 nMであった。PabPolDとssDNAおよびdsDNAの結合の強さは測定法により異なるため、どちらをより基質として好むかは断定できないが、PabPolDがこれら両DNA基質に対して結合活性を示すことは明らかである。PhoPolDについては、ゲルシフトアッセイによるDNA結合活性の測定結果が報告されている。室温で、200 nMのssDNA (25 mer) との結合活性を、アガロースゲル電気泳動で検出しているが、PhoPolDの濃度を470 nM以上にしてもほとんどシフトバンドが検出されていない。また、120 nMのPhoPolDと200 nMのssDNA (25 mer)、dsDNA (25 mer/25 mer)、primed DNA (25 mer/33 mer) と反応させた時のシフトバンドの割合を測定しており、このときのシフトバンドの割合はそれぞれおよそ、5%、20%、20%程度であった (Shen et al., 2003)。

以上報告されている他の種のファミリーD DNAポリメラーゼとTkoPolDのDNA結合活性の結果を併せて考察する。TkoPolDのDNA基質への結合活性は、primed DNAが最も高く、ついでdsDNAでありssDNAにはほとんど結合活性が見られなかった。PhoPolDおよびPabPolDもprimed DNAに対して最もDNA結合活性が強いことは共通していると考えられる。PhoPolDはssDNAに対して結合活性がほとんど検出されなかったのはTkoPolDと同様であったが、PabPolDはssDNAに対しても、測定方法によって多少の強弱の差はあるものの、primed DNAと同様、またはそれよりも弱い結合活性を示している点でTkoPolDとは基質特異性が異なっていた。他の種では直接DNA結合活性を見てはいないが、PfuPolDではssDNAを基質として強い3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出されている (Ishino and Ishino, 2001)。TkoPolDの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は、ssDNAに対しては活性が低く、primed DNAを基質としたときに高い活性を発揮する。これは、DNA結合活性の傾向と同様であり、TkoPolDはssDNAに対する結合活性が低いため、ssDNAに対する3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は低いと考えられる。よって、PfuPolDがssDNAに対して3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を発揮するということは、PfuPolDはPabPolDと同様にssDNAとの結合活性が高いのではないかと推測できる。ファミリーD DNAポリメラーゼのssDNAに対する結合活性が種間で差があることについては、どのような要因のためにこのような差が生じるかどうかまだわからないが、ファミリーD DNAポリメラーゼ-DNA複合体の立体構造が解明されれば、何か考察することができよう。ファミリーD DNAポリメラーゼとDNAとの結合部位がわかると各種間のファミリーD DNAポリメラーゼがDNA結合に関与しているアミノ酸を比較することができる。他のファミリーではあるが、*T. kodakarensis*と*P. furiosus*に代表される多くの好熱性アーキア由来ファミリーB DNAポリメラーゼの構造が解かれており、その構造とアミノ酸配列がどのように活性影響するか知見が集まっている (Elshawadfy et al., 2014; Hashimoto et al., 2001; Kim et al., 2008)。それぞれの種のファミリーD DNAポリメラーゼのDNA結合に関与するアミノ酸配列の違いが基質DNAへの結合活性の強さの違いへと表れている可能性が考えられる。

また、基質DNAとの解離定数について、TkoPolDとprimed DNAとの解離定数は7.0 nMであった。ゲルシフトアッセイを用いた他の種のファミリーD DNAポリメラーゼの結果は、今回の結果よりも一桁以上大きい解離定数であった。一方、PabPolDにおいて、SPR法および蛍光異方測定法で算出された解離定数は56 nMおよび10 nMであった。SPR法および蛍光異方測定法は、溶液中でのタンパク質と基質DNAの結合を直接観察しており、ファミリーD DNAポリメラーゼ本来のDNA結合活性に近い現象を観察しているといえる。本研究結果がSPR法と蛍光異方測定法の結果と近かったということについて、次の二通りの考察ができる。一つ目は、TkoPolDは他の種のファミリーD DNAポリメラーゼよりも強いDNA結合能を有しているためゲルシフトアッセイ時の電気泳動中でもDNAとの結合が強固に保持されているということである。二つ目は、本実験手法がTkoPolDとDNAの結合を観察できる至適な条件であったということである。本実験を行う際、アガロースゲルに予備泳動 (プレランニング) をするかしな

いかで結果に大きな差があった。予備泳動のどのような要因がタンパク質の電気泳動に影響しているかどうかはよくわかっていないが、少なくとも予備泳動を行うことによって、より感度良くタンパク質とDNAとの結合活性を観察できた。

TkoPolDのDNA結合活性の二価金属イオン依存性について、二価金属イオンが存在していない条件と2 mMのマグネシウムイオンが存在する条件を比較すると、両者ともにTkoPolDの濃度が10–20 nMの間でバンドが上部にシフトした。また、10 mMのマンガンイオン添加条件では、明確なシフトバンドは観察されないが、TkoPolDの濃度が20 nMの時に、タンパク質と結合していない位置に相当するDNAのバンドが消失し、代わりに結合したと考えられる上部のシフトバンドと、TkoPolDの3′–5′エキソヌクレアーゼ活性によって分解されたと考えられる下部のバンドが検出された。基質DNAがエキソヌクレアーゼ活性によって分解されるためにはタンパク質と一度結合しないといけないことを考慮すると、下部のバンドもタンパク質と結合したDNAとみなせる。すなわち、マンガンイオン存在下でもTkoPolDの濃度が10–20 nMの間で大部分のDNAがTkoPolDと結合していたと考えられる (図 2-10)。以上より、二価金属イオンが存在しない条件とマグネシウムイオンおよびマンガンイオンが存在する条件でのDNA結合活性に差が見られないことから、TkoPolDのDNA結合活性は二価金属イオンに依存しないことが示唆された。マンガンイオン添加時に3′–5′エキソヌクレアーゼ活性が見られ、マグネシウムイオン添加時に活性が見られないのは、マンガンイオン存在下の方がマグネシウムイオンよりもエキソヌクレアーゼ活性は強いからである (図 2-5)。DNA結合活性の実験では、40°Cという条件ため、マグネシウムイオンの場合では3′–5′エキソヌクレアーゼ活性が検出できない程度まで低下していたが、マンガンイオンの場合ではアガロースゲルでも検出できる程度の活性を有していたのだと考えられる。

本研究の成果の一つとして、各サブユニットのDNA結合活性を詳細に測定したことがある。他の種ではファミリーD DNAポリメラーゼ複合体のDNA結合活性しか調べられておらず、本研究によりTkoPolD複合体のうち、TkoDP2がDNA結合活性を担っており、TkoDP1にはほとんどDNA結合活性がないことが初めて明らかとなった。

2.4.5. 立体構造

TkoPolDの大きさについて考察する。球状タンパク質としてBSAをモデルに議論を進める。単量体BSAの流体力学半径(ストークス半径)はそれぞれ34 Å、二量体BSAは46 Åである(Valstar et al., 2000)。TkoPolDがヘテロ二量体であると仮定した場合の分子量(23,096.2)はBSAの分子量(66,462.9)のおよそ3.5倍の大きさである。単量体および二量体BSAの流体力学半径の値は分子量と比例していると単純に仮定した場合、分子量230,000での流体力学半径は約65 Å程度であると見積もられる。これは、電子顕微鏡の投影像から計算された大きさ

(図 2-11) よりも小さいことから、TkoPolD は理想的な球形ではなく、扁平な形状をしているものと推測された。分子が球状ではない場合、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーでは、アミノ酸配列から計算される分子量よりも早い位置で溶出されるため、見かけの分子量が大きくなる。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーの溶出位置から計算した TkoPolD の分子量は 370,000 であり、アミノ酸配列から計算された分子量の 230,962.6 よりも大きかった (図 2-1 (d)) ことから、TkoPolD が理想的な球状ではないことが示唆された。静的光散乱の測定結果から算出された分子量より TkoPolD はヘテロ二量体構造であると予想されたが、本実験で得られた TkoPolD の投影像に明らかな対称性が見られなかったことは、TkoPolD がヘテロ二量体であることと矛盾はしていないと考えられる。電子顕微鏡の投影像からは TkoPolD のいくつかのドメイン構造が観察された。電子顕微鏡の投影像から TkoDP1 および TkoDP2 の場所を特定するという問題が残っているが、それはどちらかのタンパク質にタグタンパク質を付加することで場所を特定する方法や配列上相同性のある立体構造既知のタンパク質を当てはめて一致するかを検証する方法が考えられる。

本研究を進めている途中、2016 年に他の研究グループより *P. abyssi* において、X 線結晶構造解析の結果から、小サブユニットの N 末端側を除いた PabDP1(144-622) と、大サブユニットの C 末端側を除いた PabDP2(1-1050) それぞれサブユニットの部分構造が報告された (Sauguet et al., 2016)。この報告により、これまで他の DNA ポリメラーゼと配列の相同性がなく不明であったファミリー D DNA ポリメラーゼの反応機構の解明に大きな期待が持たれた。電子顕微鏡による解析で得られた投影像と、報告された PabPolD の各サブユニットを比較する。PabDP2(1-1050) の大きさは $55 \times 60 \times 110 \text{ \AA}^3$ であり、PabDP1(144-622) の大きさについては論文中で言及されていないが、著者が報告された構造の大きさを測定した結果では $36 \times 45 \times 77 \text{ \AA}^3$ であった。TkoPolD と PabPolD の大きさが同じくらいであると仮定すると、TkoDP2 は「アヒル」の胴体部分に TkoDP1 は「アヒル」の頭部の大きさと概ね一致していると考えた。このような配置で複合体を形成している場合、大きさの実測値から図の「横 (PabDP1 だと $77 \text{ \AA}$ 、PabDP2 だと $110 \text{ \AA}$)」と比べて「奥行 (PabDP1 だと $36 \text{ \AA}$ または $45 \text{ \AA}$ 、PabDP2 だと $55 \text{ \AA}$ または $60 \text{ \AA}$)」は半分程度の長さになっており、このことから TkoPolD は扁平な構造であると推測できる。TkoPolD の電子顕微鏡の投影像に PabDP1 と PabDP2 の部分構造を当てはめることで TkoPolD 複合体の推定構造モデルが作製された (図 2-11 (c))。この場合でも「アヒル」の頭の部分に TkoDP1 が、胴体の部分に TkoDP2 が当てはまった。またこのモデルから作製した TkoPolD も投影像モデルは、実際に観測された単粒子解析の結果と類似していた (図 2-11 (d))。以上より、電子顕微鏡での単粒子解析の結果からも TkoPolD は溶液中でヘテロ二量体構造をとっていて、球形よりは扁平な形であると考えられる。また構造モデルからも、TkoPolD はゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の見積もりが困難であることの証左となった。従って、TkoPolD など、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分子量の

測定が困難なタンパク質の多量体構造を決定には、分子の構造によらない静的光散乱による絶対分子量の測定が非常に効果的であるといえる。

各サブユニット単独の部分構造に続いて、2019年に、*P. abyssi*において PabPolD と DNA との複合体の構造がクライオ電子顕微鏡による解析により決定された (Raia et al., 2019)。ここで報告された知見は、本研究結果をサポートしているものが多い。DNA に結合していると考えられるアミノ酸残基は大サブユニットに保存されていたが、これは TkoDP2 のみで DNA 結合活性を示すという結果と一致している。また、PabDP2(1-1050)と PabPolD-DNA 複合体の構造を比較すると、PabPolD では PabDP2 の構造が大きく変化していることがわかったが、これは TkoDP2 が DNA に結合するにも関わらず単独ではポリメラーゼ活性が検出されず、TkoDP1 と複合体を形成することによる構造変化が必要であるという予想を裏付けている。また、TkoPolD の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の産物は、10 ヌクレオチド以下のものが検出されなかったことから TkoPolD と DNA が安定な複合体を形成できるのはプライマー鎖の長さが 10 ヌクレオチド以上であるという予想ができた。PabPolD-DNA 複合体の構造をみると、PabPolD はプライマー鎖の 3'末端から 10 ヌクレオチドの位置までを覆うような形で DNA と結合していることがわかる (図 2-12 (a))。TkoPolD の生化学解析の結果から予想した安定に結合できる最短のプライマー鎖長は、複合体の構造からも支持されたと考えている。また、この構造から PabPolD のポリメラーゼモードと 3'-5'エキソヌクレアーゼモードの構造変化についても説明がされている。プライマー鎖の 3'末端にミスマッチ塩基対がある場合には、PabPolD が後退することで 3'末端が PabDP1 の触媒部位の方へ向かって伸びていくことが予想されている (図 2-12 (b))。

最後に構造から予想された DNA ポリメラーゼの進化について紹介する。構造サブユニット単独での構造と複合体の構造から、ファミリーD DNA ポリメラーゼの構造的な特徴が明らかになってきた (図 2-13)。既知のポリメラーゼと配列の相同性が見られなかったファミリーD DNA ポリメラーゼの大サブユニットは、two double-psi β barrels (DPBBs) 構造というモチーフであった (Sauguet et al., 2016) (図 2-13 (c))。この構造は転写に関わる RNA ポリメラーゼに広く見つかる構造であり、すべてのドメインの生物や一部のウイルスの RNA ポリメラーゼが用いている共通の構造であった (reviewed in Ruprich-Robert and Thuriaux, 2010)。DPBB-1 は DNA 結合に関与しており、DPBB-2 はマグネシウムイオンと結合する触媒ループを有している。ファミリーD DNA ポリメラーゼが RNA ポリメラーゼと共通して機能的な構造を有していることから、もしかするとアーキアの祖先細胞では RNA の転写と DNA の複製を一つのポリメラーゼで行っており、進化の早い段階で DNA 複製により適応したファミリーD DNA ポリメラーゼへと進化していったということが予想されている (Sauguet et al., 2016)。また、PabPolD-DNA 複合体の構造から、PabDP1 と PabDP2 の C 末端側のジンクフィンガーIII が相互作用していることが明らかとなったが、その構造は真核生物の Pol ϵ と Pol α の構造とよく似

ていた (Raia et al., 2019)。この知見より、アーキアと真核生物共通の祖先細胞内におけるファミリーD DNA ポリメラーゼの進化について仮説が立てられた (図 2-14)。アーキアの共通祖先細胞内ではファミリーD DNA ポリメラーゼの大サブユニットが複製と転写の両方を行っていた。これがホスホジエステラーゼドメインを持ったタンパク質と融合し、現在のファミリーD DNA ポリメラーゼになった。アーキアと真核生物の共通の祖先において、大サブユニットの触媒ドメインがファミリーB DNA ポリメラーゼと入れ替わり、ファミリーD DNA ポリメラーゼの小サブユニットと大サブユニットのジンクフィンガーの部分とファミリーB DNA ポリメラーゼが融合したキメラポリメラーゼが生まれ、それらが真核生物へと受け継がれていった。ファミリーB DNA ポリメラーゼにはポリメラーゼ活性と 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性両方の触媒部位があることから、この進化の過程で小サブユニットのエキソヌクレアーゼ活性部位が不活性化され、現在の真核生物の DNA ポリメラーゼの B サブユニットとなった、という仮説である。この仮説が本当かどうかはわからないが、配列の詳細な解析から提唱された DNA ポリメラーゼの分子進化に関する仮説 (図 0-1) (Makarova et al., 2014; Tahirov et al., 2009) と矛盾しておらず、DNA ポリメラーゼの進化的な意義を考える上で非常に興味深い仮説である。

結論

本研究は、ファミリーD DNA ポリメラーゼについて、それぞれのサブユニットまたは複合体の基本的な生化学的性状の解析および構造情報を明らかにすることを目的に進められた。ファミリーD DNA ポリメラーゼはアーキア固有の DNA ポリメラーゼであり、他のファミリーのポリメラーゼと比較して解明されている情報に乏しいタンパク質である。複合体全体の立体構造や基質 DNA と結合した構造がわかっていないため、どのような機構で DNA を合成しているのか不明である。ファミリーD DNA ポリメラーゼは、アーキアの DNA 複製において多くの複製タンパク質と相互作用し、実際に DNA 鎖を合成する酵素として主要な役割を果たしていると考えられている。また、高いポリメラーゼ活性と校正機能を有していることから PCR 酵素のように産業利用の可能性もある。ファミリーD DNA ポリメラーゼは分子生物学的だけでなく進化学的な側面からも魅力的なタンパク質であり、共通祖先では祖先型のファミリーD DNA ポリメラーゼが DNA 合成と RNA 転写の両方を担っていたかもしれない。

このようにファミリーD DNA ポリメラーゼは「夢の詰まった」タンパク質である。

著者は本研究対象として、*T. kodakarensis* 由来のファミリーD DNA ポリメラーゼを用いた。好熱性アーキア由来のタンパク質のため常温生物由来のタンパク質より安定である可能性が高いこと、遺伝子操作系が確立されているため将来的に *in vivo* での研究の発展が見込めること、アーキアの中では広く研究されている生物であり様々な知見が蓄積されていること、がその理由として挙げられる。また、著者が研究を始める直前に *T. kodakarensis* のファミリーB DNA ポリメラーゼ遺伝子の欠損株が単離され、ファミリーD DNA ポリメラーゼの重要性が高まったことも、本菌由来のファミリーD DNA ポリメラーゼを研究対象にした大きな理由である。

第一章では、これまでの研究で困難であった各サブユニット単独での高純度な精製方法の確立と、TkoPolD のより高純度な精製方法の開発を目指した。

TkoDP1 は、大腸菌を宿主に用いて産生すると、タンパク質産生の段階で分解が進んでおり、その後のカラムクロマトグラフィーでも高純度な精製が困難であったが、昆虫細胞 Sf9 とバキュロウイルスベクターによる産生系では、タンパク質産生時に分解を受けなかった。その結果、高純度な TkoDP1 を精製することができた。

TkoDP2 は大腸菌でシャペロンとともに共産生させ、三種の分離原理の異なるカラムクロマトグラフィーにより高純度に精製することができた。

TkoPolD は大腸菌で TkoDP1 と TkoDP2 を共産生させ、細胞内で TkoPolD 複合体を形成させた。これを三種の分離原理の異なるカラムクロマトグラフィーによって高純度に精製することができた。

とりわけ高純度な TkoDP2 と TkoPolD の精製には ENrich Q 5/50 カラムが大きく貢献した。ENrich Q 5/50 カラムによって従来までは分離できなかった TkoDP2 の分解物が効率よく分離できたため、TkoDP2 および TkoPolD の最終的な精製純度と収率が上がった。

本研究では全てのタンパク質を、タグの付加をなしに高純度に精製することができた。これにより、後の生化学解析及び構造解析においてタンパク質本来の正確な性質を観察できるようになった。

第二章では、高純度に精製した TkoDP1、TkoDP2 および TkoPolD を用いて種々の生化学的性状の同定を試みた。

ファミリーD DNA ポリメラーゼの複合体の構成比は常に議論されてきている問題の一つであった。本研究ではタンパク質の形の影響を受けにくい分子量測定手法である静的光散乱を用いることにより、TkoPolD はヘテロ二量体 (DP1 : DP2 = 1 : 1) であることを同定した。また、電子顕微鏡を用いた単粒子解析からもこの結果を支持する投影像と推定構造モデルが得られた。

TkoPolD は強いヌクレオチド取込み活性を示したが、TkoDP1 および TkoDP2 単独ではヌクレオチド取込み活性は検出されなかった。

TkoPolD は 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており、その活性の強さは基質 DNA の構造によって変化した。また、それは TkoPolD の基質 DNA への結合活性の強さと相関があり、DNA 結合活性が強いほど 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が強くなる傾向が観察された。また、反応溶液中に二価金属イオンとしてマグネシウムイオンよりもマンガンイオンを加えた条件の方が 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が顕著に強くなった。これは TkoDP1 単独でも同様に、反応溶液中にマンガンイオンがある条件では TkoDP1 単独でも 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が検出された。ただし、これは高濃度の TkoDP1 を反応に用いた場合であるため、TkoDP1 単独での 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は TkoPolD 複合体と比較すると顕著に低いと考えられる。TkoDP2 は 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示さなかった。

TkoPolD は primed DNA および dsDNA に対し強い DNA 結合活性を示したが、ssDNA に対しては結合活性が低かった。また、各サブユニット単独では、TkoDP2 が TkoPolD と同程度もしくは少し強い DNA 結合活性を示した。逆に TkoDP1 はどのような構造の基質 DNA に対しても DNA 結合活性を示さなかった。また、TkoPolD の DNA 結合活性は、反応溶液中の二価金属イオンの種類に依存しなかった。

再構成された TkoDP1+DP2 は TkoPolD と比較して同じ強さのヌクレオチド取込み活性、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性および DNA 結合活性を示した。

TkoPolD が実際に校正ポリメラーゼとして機能しているかどうかを検証した。細胞内を模した二価金属イオン濃度条件下において、ミスマッチ塩基対を含まない基質 DNA に対しては 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性はほとんど検出されなかった一方、プライマー鎖の 3'末端にミスマッチを含む基質 DNA の場合には、ミスマッチ塩基の数に応じた強さの活性を発揮した。この結果は TkoPolD の校正機能が実際の細胞内での DNA 複製では正確に制御されていることを強く示唆している。

TkoPolD と他のアーキア由来のファミリーD DNA ポリメラーゼの生化学的性状を比較した結果、著者はファミリーD DNA ポリメラーゼの基本的な性質を次のように考えた。ファミリーD DNA ポリメラーゼは溶液中で大小二つのサブユニットから成るヘテロ二量体構造をとり、高いポリメラーゼ活性と 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性および DNA 結合活性を有している。各サブユニット単独ではポリメラーゼ活性も 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性もほとんど示さず顕著に低い。強いポリメラーゼ活性には大サブユニット自体の構造変化が必要であり、強い 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性には大サブユニットによる基質 DNA と小サブユニットの活性部位との接近が必要である。DNA 結合活性は大サブユニットが担っており、小サブユニットの DNA 結合活性は極めて低い。また、primed DNA に対して最も DNA 結合活性が強い。ssDNA への結合活性については種間の差が大きい可能性がある。

本研究は、ファミリーD DNA ポリメラーゼについて、タグの付加されていない全長の大小両方のサブユニットと共産生させた複合体をそれぞれ高純度に精製し、同時にその性質を調べた初めての報告である。サブユニット単独での性質を明らかにすることによりファミリーD DNA ポリメラーゼについて更なる知見が蓄積されるものと考えている。本研究の成果により、TkoPolD の高純度精製系を確立したことにより、TkoPolD を産業利用できる可能性ができた。現状ではタンパク質の安定性に不安が残るが、構造的に不安定な部分を改変し、活性を発揮する最小単位の安定な TkoPolD 変異体を作ることができれば、TkoPolD の高いポリメラーゼ活性や校正能力から産業利用への道が開けてくる可能性があると考えている。また、TkoPolD が高純度に精製できるようになったことで、今後ファミリーD DNA ポリメラーゼ周辺の複製タンパク質について研究が進み、アーキアの DNA 複製機構の解明に大きく寄与すると考えている。

謝辞

本研究を実施するにあたり、終始懇切なる御指導と御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 生物化学分野の石野良純教授に甚大な感謝を申し上げます。

本研究を実施と論文執筆にあたり、終始有益な御指導と御助言を賜りました副査である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 生物化学分野の石野園子准教授に深く感謝を申し上げます。

本論文の作成にあたり、副査としてご指導、御助言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 生物物理化学分野の角田佳充教授ならびに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、御指導と御助言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 生物化学分野の山上 健助教に深く感謝を申し上げます。

本研究を進める上で、電子顕微鏡による単粒子解析でお世話になりました九州大学生体防御医学研究所 分子機能制御学部門構造生物学分野の真柳浩太助教、静的光散乱を用いた解析でお世話になりましたスペクトリス株式会社マルバーン・パナリティカル事業部の松尾亮太郎氏に深く感謝を申し上げます。

本研究を遂行する上で、有益なご討論ご助言いただきました蛋白質化学工学分野（現生物化学分野）の皆様に深く感謝申し上げます。

発表論文

Takashima, N., Ishino, S., Oki, K., Takafuji, M., Yamagami, T., Matsuo, R., Mayanagi, K., and Ishino, Y. (2019). Elucidating functions of DP1 and DP2 subunits from the *Thermococcus kodakarensis* family D DNA polymerase. *Extremophiles* 23, 161-172..

引用文献

- Abellón-Ruiz, J., Waldron, K.J., and Connolly, B.A. (2016). *Archaeoglobus fulgidus* DNA polymerase D: a zinc-binding protein inhibited by hypoxanthine and uracil. *J. Mol. Biol.* 428, 2805–2813.
- Aravind, L., and Koonin, E. V (1998). Phosphoesterase domains associated with DNA polymerases of diverse origins. *Nucleic Acids Res.* 26, 3746–3752.
- Atomí, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M., and Imanaka, T. (2004). Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* 1, 263–267.
- Bauer, R.J., Begley, M.T., and Trakselis, M.A. (2012). Kinetics and fidelity of polymerization by DNA polymerase III from *Sulfolobus solfataricus*. *Biochemistry* 51, 1996–2007.
- Berquist, B.R., DasSarma, P., and DasSarma, S. (2007). Essential and non-essential DNA replication genes in the model halophilic Archaeon, *Halobacterium* sp. NRC-1. *BMC Genet.* 8, 31.
- Bourdeau, R.W., Malito, E., Chenal, A., Bishop, B.L., Musch, M.W., Villereal, M.L., Chang, E.B., Mosser, E.M., Rest, R.F., and Tang, W.J. (2009). Cellular functions and X-ray structure of anthrolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin secreted by *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* 284, 14645–14656.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008). Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 245–252.
- 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.
- Burkhart, B.W., Cubonova, L., Heider, M.R., Kelman, Z., Reeve, J.N., and Santangelo, T.J. (2017). The GAN exonuclease or the flap endonuclease Fen1 and RNase HII are necessary for viability of *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* 199, JB.00141-17.
- Cann, I.K., and Ishino, Y. (1999). Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics* 152, 1249–1267.
- Cann, I.K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S., and Ishino, Y. (1998). A heterodimeric DNA polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14250–14255.
- Cann, I.K., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K., and Ishino, Y. (1999). Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA polymerases in Archaea. *J. Bacteriol.* 181, 6591–6599.
- Cann, I.K., Ishino, S., Yuasa, M., Daiyasu, H., Toh, H., and Ishino, Y. (2001). Biochemical analysis of replication factor C from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 183, 2614–2623.

- Castrec, B., Rouillon, C., Henneke, G., Flament, D., Querellou, J., and Raffin, J.-P. (2009). Binding to PCNA in Euryarchaeal DNA replication requires two PIP motifs for DNA polymerase D and one PIP motif for DNA polymerase B. *J. Mol. Biol.* *394*, 209–218.
- Castrec, B., Laurent, S., Henneke, G., Flament, D., and Raffin, J.-P. (2010). The glycine-rich motif of *Pyrococcus abyssi* DNA polymerase D is critical for protein stability. *J. Mol. Biol.* *396*, 840–848.
- Cubonová, L., Richardson, T., Burkhart, B.W., Kelman, Z., Connolly, B. a, Reeve, J.N., and Santangelo, T.J. (2013). Archaeal DNA polymerase D but not DNA polymerase B is required for genome replication in *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* *195*, 2322–2328.
- Dumorné, K., Córdova, D.C., Astorga-Eló, M., and Renganathan, P. (2017). Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J. Microbiol. Biotechnol.* *27*, 649–659.
- Edgell, D.R., Malik, S.B., and Doolittle, W.F. (1998). Evidence of independent gene duplications during the evolution of archaeal and eukaryotic family B DNA polymerases. *Mol. Biol. Evol.* *15*, 1207–1217.
- Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., et al. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8102–8107.
- Elshawadfy, A.M., Keith, B.J., Ee Ooi, H., Kinsman, T., Heslop, P., and Connolly, B.A. (2014). DNA polymerase hybrids derived from the family-B enzymes of *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus kodakarensis*: Improving performance in the polymerase chain reaction. *Front. Microbiol.* *5*, 1–14.
- Franklin, M.C., Wang, J., and Steitz, T.A. (2001). Structure of the replicating complex of a pol alpha family DNA polymerase. *Cell* *105*, 657–667.
- Ganai, R.A., Bylund, G.O., and Johansson, E. (2015). Switching between polymerase and exonuclease sites in DNA polymerase ϵ . *Nucleic Acids Res.* *43*, 932–942.
- Gast, K., and Fiedler, C. (2012). Dynamic and static light scattering of intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol.* *896*, 137–161.
- Gogarten, J.P., Kibak, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B.J., Manolson, M.F., Poole, R.J., Date, T., and Oshima, T. (1989). Evolution of the vacuolar H⁺-ATPase: implications for the origin of eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 6661–6665.
- Greenough, L., Menin, J.F., Desai, N.S., Kelman, Z., and Gardner, A.F. (2014). Characterization of family D DNA polymerase from *Thermococcus* sp. 9°N. *Extremophiles* *18*, 653–664.
- Greenough, L., Kelman, Z., and Gardner, A.F. (2015). The roles of family B and D DNA polymerases in *Thermococcus* species 9°N Okazaki fragment maturation. *J. Biol. Chem.* *290*, 12514–12522.
- Gueguen, Y., Rolland, J.L., Lecompte, O., Azam, P., Le Romancer, G., Flament, D., Raffin, J.P., and Dietrich, J. (2001). Characterization of two DNA polymerases from the hyperthermophilic euryarchaeon *Pyrococcus abyssi*. *Eur. J. Biochem.* *268*, 5961–5969.

- Guy, L., and Ettema, T.J.G. (2011). The archaeal “TACK” superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol.* 19, 580–587.
- Harding, M.M. (2006). Small revisions to predicted distances around metal sites in proteins. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62, 678–682.
- Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T., and Kai, Y. (2001). Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Mol. Biol.* 306, 469–477.
- Hayashi, I., Morikawa, K., and Ishino, Y. (1999). Specific interaction between DNA polymerase II (PolD) and RadB, a Rad51/Dmc1 homolog, in *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* 27, 4695–4702.
- Henneke, G. (2012). In vitro reconstitution of RNA primer removal in Archaea reveals the existence of two pathways. *Biochem. J.* 447, 271–280.
- Henneke, G., Flament, D., Hübscher, U., Querellou, J., and Raffin, J.-P. (2005). The hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus abyssi* likely requires the two DNA polymerases D and B for DNA replication. *J. Mol. Biol.* 350, 53–64.
- Hikida, Y., Kimoto, M., Hirao, I., and Yokoyama, S. (2017). Crystal structure of Deep Vent DNA polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 52–57.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C., and Stetter, K.O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417, 63–67.
- Ikonomou, L., Schneider, Y.-J., and Agathos, S.N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 1–20.
- Imamura, M., Uemori, T., Kato, I., and Ishino, Y. (1995). A non- α -like DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 1647–1652.
- Ishino, S., and Ishino, Y. (2006). Comprehensive search for DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* 25, 681–691.
- Ishino, Y., and Ishino, S. (2001). DNA polymerases from euryarchaeota. *Methods Enzymol.* 334, 249–260.
- Ishino, Y., and Ishino, S. (2012). Rapid progress of DNA replication studies in Archaea, the third domain of life. *Sci. China. Life Sci.* 55, 386–403.
- Ishino, Y., Iwasaki, H., Fukui, H., Mineno, J., Kato, I., and Shinagawa, H. (1992). Aphidicolin inhibits DNA polymerizing activity but not nucleolytic activity of *Escherichia coli* DNA polymerase II. *Biochimie* 74, 131–136.
- Ishino, Y., Komori, K., Cann, I.K., and Koga, Y. (1998). A novel DNA polymerase family found in Archaea. *J. Bacteriol.* 180, 2232–2236.
- Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S., and Miyata, T. (1989). Evolutionary relationship of archaebacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic trees of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9355–9359.

- Jokela, M., Eskelinen, A., Pospiech, H., Rouvinen, J., and Syväoja, J.E. (2004). Characterization of the 3' exonuclease subunit DP1 of *Methanococcus jannaschii* replicative DNA polymerase D. *Nucleic Acids Res.* 32, 2430–2440.
- Jokela, M., Raki, M., Heikkinen, K., Sepponen, K., Eskelinen, A., and Syväoja, J.E. (2005). The screening of expression and purification conditions for replicative DNA polymerase associated B-subunits, assignment of the exonuclease activity to the C-terminus of archaeal pol D DP1 subunit. *Protein Expr. Purif.* 43, 73–84.
- Jones, D.T., and Cozzetto, D. (2015). DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics* 31, 857–863.
- Katoh, K., Rozewicki, J., and Yamada, K.D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 1–7.
- Kelman, L.M., and Kelman, Z. (2014). Archaeal DNA replication. *Annu. Rev. Genet.* 48, 71–97.
- Kim, S.W., Kim, D.-U., Kim, J.K., Kang, L.-W., and Cho, H.-S. (2008). Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 42, 356–361.
- Kim, Y., Eom, S.H., Wang, J., Lee, D.-S.S., Suh, S.W., and Steitz, T.A. (1995). Crystal structure of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nature* 376, 612–616.
- Koga, Y. (2014). From promiscuity to the lipid divide: on the evolution of distinct membranes in Archaea and Bacteria. *J. Mol. Evol.* 78, 234–242.
- Koga, Y., and Morii, H. (2005). Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 2019–2034.
- Komori, K., Fujita, N., Ichianagi, K., Shinagawa, H., Morikawa, K., and Ishino, Y. (1999). PI-PfuI and PI-PfuII, intein-coded homing endonucleases from *Pyrococcus furiosus*. I. Purification and identification of the homing-type endonuclease activities. *Nucleic Acids Res.* 27, 4167–4174.
- Kuba, Y., Ishino, S., Yamagami, T., Tokuhara, M., Kanai, T., Fujikane, R., Daiyasu, H., Atomi, H., and Ishino, Y. (2012). Comparative analyses of the two proliferating cell nuclear antigens from the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakarensis*. *Genes to Cells* 17, 923–937.
- Li, Z., Santangelo, T.J., Cuboňová, L., Reeve, J.N., and Kelman, Z. (2010). Affinity purification of an archaeal DNA replication protein network. *MBio* 1, e00221-10-e00221-19.
- Li, Z., Pan, M., Santangelo, T.J., Chemnitz, W., Yuan, W., Edwards, J.L., Hurwitz, J., Reeve, J.N., and Kelman, Z. (2011). A novel DNA nuclease is stimulated by association with the GINS complex. *Nucleic Acids Res.* 39, 6114–6123.
- Li, Z., Kelman, L.M., and Kelman, Z. (2013). *Thermococcus kodakarensis* DNA replication. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 332–338.
- Makarova, K.S., Krupovic, M., and Koonin, E. V (2014). Evolution of replicative DNA polymerases in archaea and their contributions to the eukaryotic replication machinery. *Front. Microbiol.* 5, 354.

- Mäkinen, M., Pospiech, H., Kilpeläinen, S., Jokela, M., Vihinen, M., and Syväoja, J.E. (1999). A novel family of DNA-polymerase-associated B subunits. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 14–16.
- Martijn, J., and Ettema, T.J.G. (2013). From archaeon to eukaryote: the evolutionary dark ages of the eukaryotic cell. *Biochem. Soc. Trans.* *41*, 451–457.
- Matsui, I., Urushibata, Y., Shen, Y., Matsui, E., and Yokoyama, H. (2011). Novel structure of an N-terminal domain that is crucial for the dimeric assembly and DNA-binding of an archaeal DNA polymerase D large subunit from *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS Lett.* *585*, 452–458.
- Matsui, I., Matsui, E., Yamasaki, K., and Yokoyama, H. (2013). Domain structures and inter-domain interactions defining the holoenzyme architecture of archaeal d-family DNA polymerase. *Life* *3*, 375–385.
- McElhinny, S.A.N., Kumar, D., Clark, A.B., Watt, D.L., Watts, B.E., Lundström, E.-B., Johansson, E., Chabes, A., and Kunkel, T.A. (2010). Genome instability due to ribonucleotide incorporation into DNA. *Nat. Chem. Biol.* *6*, 774–781.
- Miyabe, I., Kunkel, T.A., and Carr, A.M. (2011). The major roles of DNA polymerases epsilon and delta at the eukaryotic replication fork are evolutionarily conserved. *PLoS Genet.* *7*, e1002407.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., and Imanaka, T. (1994). Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* *60*, 4559–4566.
- Morrison, A., and Sugino, A. (1994). The 3'→5' exonucleases of both DNA polymerases delta and epsilon participate in correcting errors of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* *242*, 289–296.
- Morrison, A., Araki, H., Clark, A.B., Hamatake, R.K., and Sugino, A. (1990). A third essential DNA polymerase in *S. cerevisiae*. *Cell* *62*, 1143–1151.
- Motz, M., Kober, I., Girardot, C., Loeser, E., Bauer, U., Albers, M., Moeckel, G., Minch, E., Voss, H., Kilger, C., et al. (2002). Elucidation of an archaeal replication protein network to generate enhanced PCR enzymes. *J. Biol. Chem.* *277*, 16179–16188.
- Mylykallio, H., Lopez, P., López-García, P., Heilig, R., Saurin, W., Zivanovic, Y., Philippe, H., and Forterre, P. (2000). Bacterial mode of replication with eukaryotic-like machinery in a hyperthermophilic archaeon. *Science* *288*, 2212–2215.
- Nishida, H., Mayanagi, K., Kiyonari, S., Sato, Y., Oyama, T., Ishino, Y., and Morikawa, K. (2009). Structural determinant for switching between the polymerase and exonuclease modes in the PCNA-replicative DNA polymerase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20693–20698.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G.-J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., et al. (2011). Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* *39*, 3204–3223.
- van Oers, M.M., Pijlman, G.P., and Vlak, J.M. (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *J. Gen. Virol.* *96*, 6–23.

- Osz-Papai, J., Radu, L., Abdulrahman, W., Kolb-Cheynel, I., Troffer-Charlier, N., Birck, C., and Poterszman, A. (2015). Insect cells-baculovirus system for the production of difficult to express proteins. *Methods Mol. Biol.* *1258*, 181–205.
- Ouzounis, C., and Kyrpides, N. (1996). The emergence of major cellular processes in evolution. *FEBS Lett.* *390*, 119–123.
- Pavlov, Y.I., and Shcherbakova, P. V. (2010). DNA polymerases at the eukaryotic fork-20 years later. *Mutat. Res.* *685*, 45–53.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* *25*, 1605–1612.
- Pomerantz, R.T., and O'Donnell, M. (2007). Replisome mechanics: insights into a twin DNA polymerase machine. *Trends Microbiol.* *15*, 156–164.
- Raia, P., Carroni, M., Henry, E., Pehau-Arnaudet, G., Brûlé, S., Béguin, P., Henneke, G., Lindahl, E., Delarue, M., and Sauguet, L. (2019). Structure of the DP1-DP2 PolD complex bound with DNA and its implications for the evolutionary history of DNA and RNA polymerases. *PLoS Biol.* *17*, e3000122.
- Ralec, C., Henry, E., Lemor, M., Killelea, T., and Henneke, G. (2017). Calcium-driven DNA synthesis by a high-fidelity DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* *45*, 12425–12440.
- Richardson, T.T., Gilroy, L., Ishino, Y., Connolly, B. a, and Henneke, G. (2013). Novel inhibition of archaeal family-D DNA polymerase by uracil. *Nucleic Acids Res.* *41*, 4207–4218.
- 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.
- Rouillon, C., Henneke, G., Flament, D., Querellou, J., and Raffin, J.-P. (2007). DNA polymerase switching on homotrimeric PCNA at the replication fork of the euryarchaea *Pyrococcus abyssi*. *J. Mol. Biol.* *369*, 343–355.
- Ruprich-Robert, G., and Thuriaux, P. (2010). Non-canonical DNA transcription enzymes and the conservation of two-barrel RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* *38*, 4559–4569.
- Sarmiento, F., Mrázek, J., and Whitman, W.B. (2013). Genome-scale analysis of gene function in the hydrogenotrophic methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4726–4731.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2005). Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 3889–3899.
- Sauguet, L., Raia, P., Henneke, G., and Delarue, M. (2016). Shared active site architecture between archaeal PolD and multi-subunit RNA polymerases revealed by X-ray crystallography. *Nat. Commun.* *7*, 12227.

- Schermerhorn, K.M., and Gardner, A.F. (2015). Pre-steady-state kinetic analysis of a family D DNA polymerase from *Thermococcus* sp. 9°N reveals mechanisms for Archaeal genomic replication and maintenance. *J. Biol. Chem.* 290, 21800–21810.
- Shcherbakova, P. V., and Pavlov, Y.I. (1996). 3'→5' exonucleases of DNA polymerases epsilon and delta correct base analog induced DNA replication errors on opposite DNA strands in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 142, 717–726.
- Shen, Y., Musti, K., Hiramoto, M., Kikuchi, H., Kawarabayashi, Y., and Matsui, I. (2001). Invariant Asp-1122 and Asp-1124 are essential residues for polymerization catalysis of family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* 276, 27376–27383.
- Shen, Y., Tang, X.-F., and Matsui, I. (2003). Subunit interaction and regulation of activity through terminal domains of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *J. Biol. Chem.* 278, 21247–21257.
- Shen, Y., Tang, X.F., Yokoyama, H., Matsui, E., and Matsui, I. (2004a). A 21-amino acid peptide from the cysteine cluster II of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii* stimulates its nuclease activity which is Mre11-like and prefers manganese ion as the cofactor. *Nucleic Acids Res.* 32, 158–168.
- Shen, Y., Tang, X.-F., Matsui, E., and Matsui, I. (2004b). Subunit interaction and regulation of activity through terminal domains of the family D DNA polymerase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 245–249.
- Tahirov, T.H., Makarova, K.S., Rogozin, I.B., Pavlov, Y.I., and Koonin, E. V (2009). Evolution of DNA polymerases: an inactivated polymerase-exonuclease module in Pol ε and a chimeric origin of eukaryotic polymerases from two classes of archaeal ancestors. *Biol. Direct* 4, 11.
- Takagi, M., Nishioka, M., Kakiyama, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T. (1997). Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4504–4510.
- Tang, X.-F., Shen, Y., Matsui, E., and Matsui, I. (2004). Domain topology of the DNA polymerase D complex from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* 43, 11818–11827.
- Tompa, P. (2012). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem. Sci.* 37, 509–516.
- Tori, K., Kimizu, M., Ishino, S., and Ishino, Y. (2007). DNA polymerases BI and D from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* both bind to proliferating cell nuclear antigen with their C-terminal PIP-box motifs. *J. Bacteriol.* 189, 5652–5657.
- Tsai, S.-J., Hong, C.-J., Cheng, C.-Y., Liao, D.-L., and Liou, Y.-J. (2007). Association study of polymorphisms in post-synaptic density protein 95 (PSD-95) with schizophrenia. *J. Neural Transm.* 114, 423–426.
- Uemori, T., Ishino, Y., Toh, H., Asada, K., and Kato, I. (1993). Organization and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res.* 21, 259–265.
- Uemori, T., Ishino, Y., Doi, H., and Kato, I. (1995). The hyperthermophilic archaeon *Pyrodictum occultum* has two alpha-like DNA polymerases. *J. Bacteriol.* 177, 2164–2177.

- Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H., and Ishino, Y. (1997). A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: gene cloning, expression, and characterization. *Genes Cells* 2, 499–512.
- Uversky, V.N. (2012). Size-exclusion chromatography in structural analysis of intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol.* 896, 179–194.
- Valstar, A., Almgren, M., Brown, W., and Vasilescu, M. (2000). The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering. *Langmuir* 16, 922–927.
- Vashishtha, A.K., Wang, J., and Konigsberg, W.H. (2016). Different divalent cations alter the kinetics and fidelity of DNA polymerases. *J. Biol. Chem.* 291, 20869–20875.
- Warbrick, E. (1998). PCNA binding through a conserved motif. *Bioessays* 20, 195–199.
- Warbrick, E., Lane, D.P., Glover, D.M., and Cox, L.S. (1997). Homologous regions of Fen1 and p21Cip1 compete for binding to the same site on PCNA: a potential mechanism to co-ordinate DNA replication and repair. *Oncogene* 14, 2313–2321.
- Weiss, M.C., Preiner, M., Xavier, J.C., Zimorski, V., and Martin, W.F. (2018). The last universal common ancestor between ancient Earth chemistry and the onset of genetics. *PLoS Genet.* 14, e1007518.
- Weiss, S., Famulok, M., Edenhofer, F., Wang, Y.H., Jones, I.M., Groschup, M., and Winnacker, E.L. (1995). Overexpression of active Syrian golden hamster prion protein PrPc as a glutathione S-transferase fusion in heterologous systems. *J. Virol.* 69, 4776–4783.
- Wen, J., Arakawa, T., and Philo, J.S. (1996). Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Anal. Biochem.* 240, 155–166.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4576–4579.
- Wynne, S. a, Pinheiro, V.B., Holliger, P., and Leslie, A.G.W. (2013). Structures of an apo and a binary complex of an evolved archeal B family DNA polymerase capable of synthesising highly cy-dye labelled DNA. *PLoS One* 8, e70892.
- Xia, S., Wang, M., Blaha, G., Konigsberg, W.H., and Wang, J. (2011). Structural insights into complete metal ion coordination from ternary complexes of B family RB69 DNA polymerase. *Biochemistry* 50, 9114–9124.
- Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y., and Ishino, Y. (2014). Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Front. Microbiol.* 5, 461.

- Yamasaki, K., Urushibata, Y., Yamasaki, T., Arisaka, F., and Matsui, I. (2010). Solution structure of the N-terminal domain of the archaeal D-family DNA polymerase small subunit reveals evolutionary relationship to eukaryotic B-family polymerases. *FEBS Lett.* *584*, 3370–3375.
- Yao, N.Y., and O'Donnell, M.E. (2016). Evolution of replication machines. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* *51*, 135–149.
- Zhang, K. (2016). Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* *193*, 1–12.
- 瀧石 祐太 (2010). 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* 由来 Family D DNA ポリメラーゼに関する生化学的機能解析. 修士論文

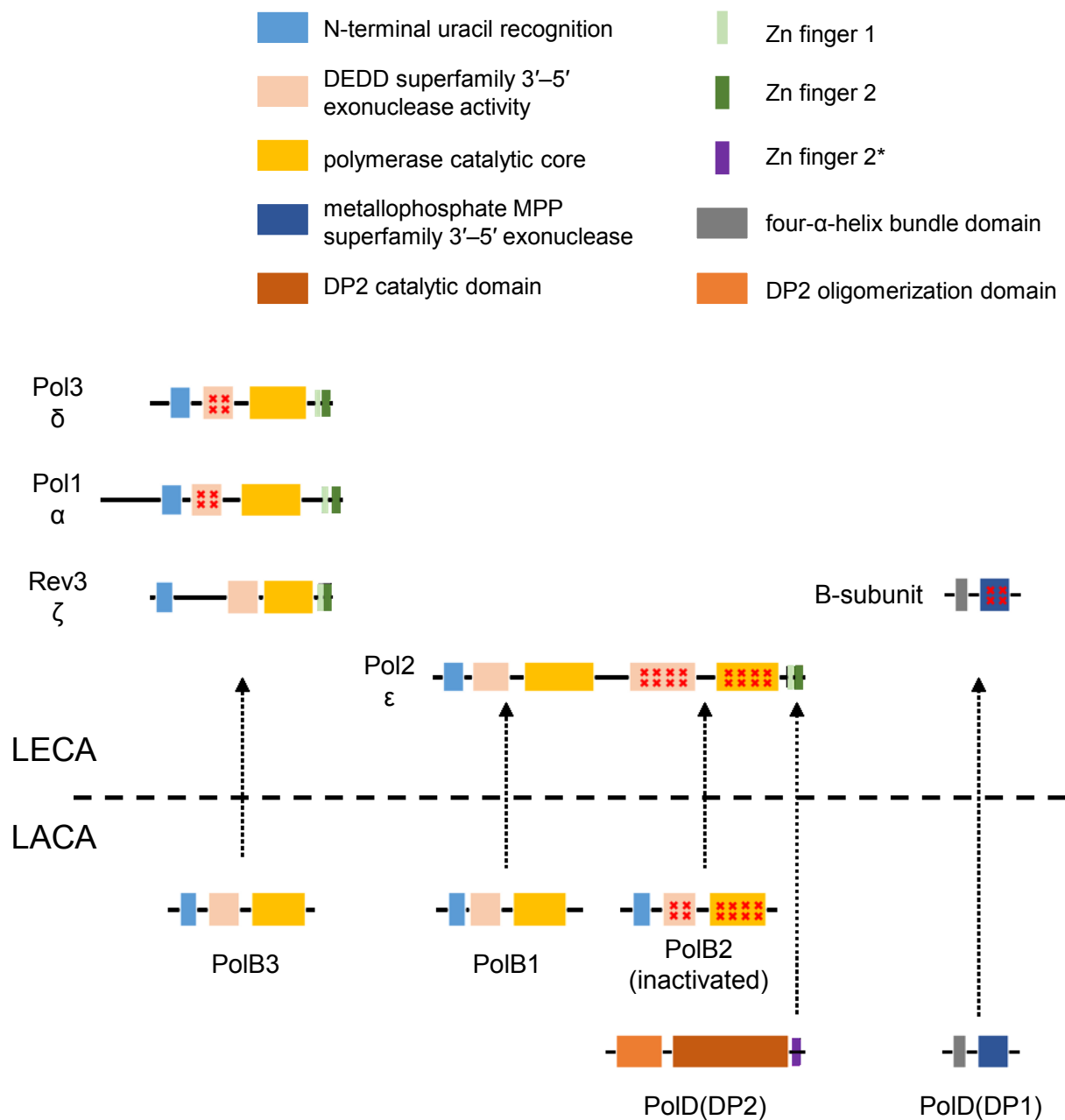


図 0-1 アーキアおよび真核生物の最後の共通祖先における複製DNAポリメラーゼの構成ドメインの進化的関係と再構築仮説

最後のアーキアの共通祖先 (LACA) と真核生物の共通祖先 (LECA) におけるファミリーBおよびファミリーD DNAポリメラーゼ遺伝子の予想とそのドメイン構成。相同性のあるドメインは同じ色と形で示している。不活性化ドメインは×で示している。真核生物のポリメラーゼのファミリー名はヒトおよび酵母の名前を記載している。LACA: last archaeal common ancestors、LECA: last eukaryotic common ancestors。本図はMakarovaらの報告をもとに作成した (Makarova et al., 2014)。

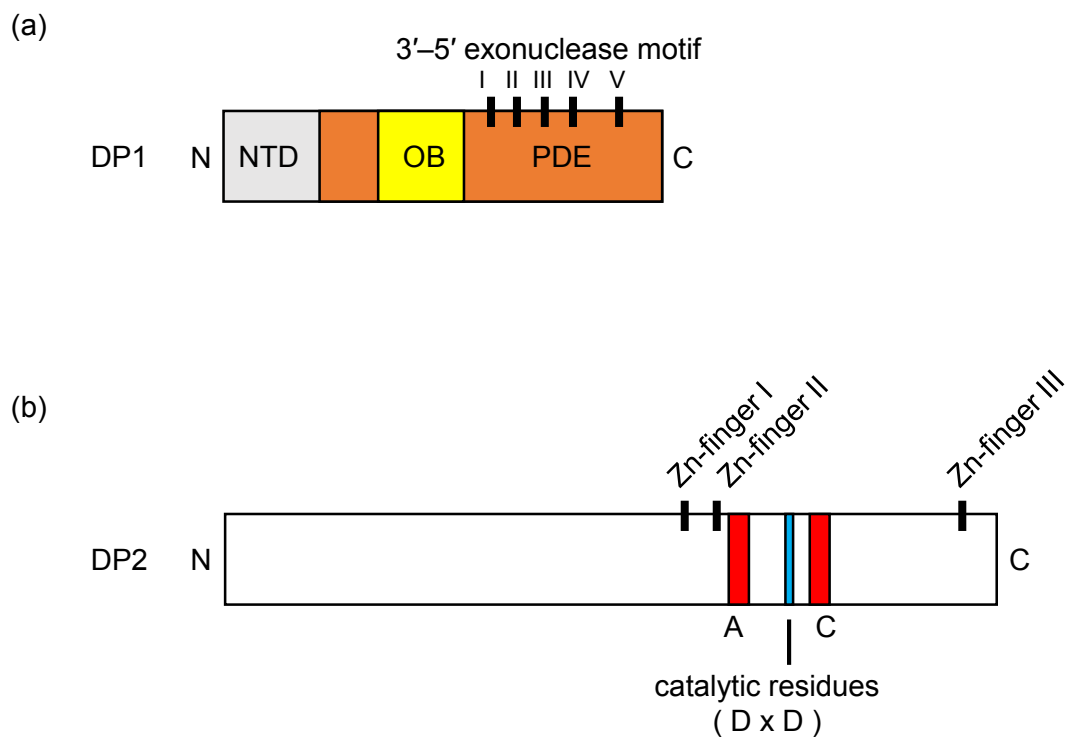


図 1-1 ファミリーD DNAポリメラーゼの各サブユニットのドメイン構成

(a) 小サブユニットのドメイン構成の模式図。それぞれ、灰色: N-terminal domain、オレンジ: phosphodiesterase (PDE) domain、黄: OB domain、黒線: 3'-5'エキソヌクラーゼモチーフを表している。(b) 大サブユニットのドメイン構成の模式図。赤: polymerase motif、青: catalytic residues、黒線: Zn-finger I、II、IIIを表している。

motif I

*

*

<

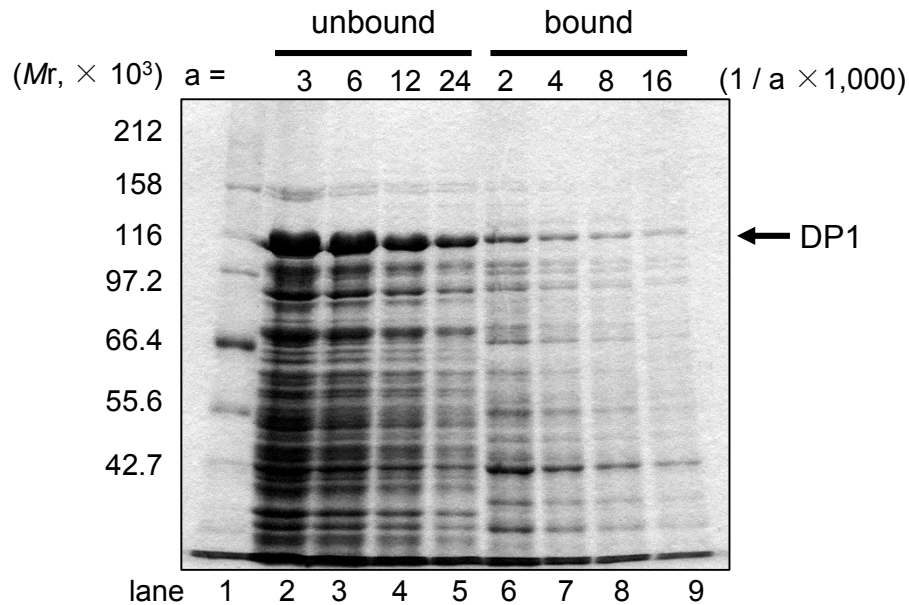
図 1-2 小サブユニットのエキソヌクレアーゼモチーフのアライメント

Tkoの配列両端の数字はTkoDP1でN末端から何番目のアミノ酸残基かを表している。配列中の青色は金属イオンの結合に関わるアミノ酸残基を、オレンジ色は触媒活性に関わるアミノ酸残基を示している。* はTkoDP1に変異を導入したアミノ酸残基を示している。Tko; *T. kodakarensis*、Pab; *P. abyssi*、Pho; *P. horikoshii*、Pfu; *P. furiosus*、Mja; *M. jannaschii*、9°N; *Thermococcus* sp. 9°N。

(a)

HAT tag: KDHLIHNVHKEEHAHAHNK

(b)



(c)

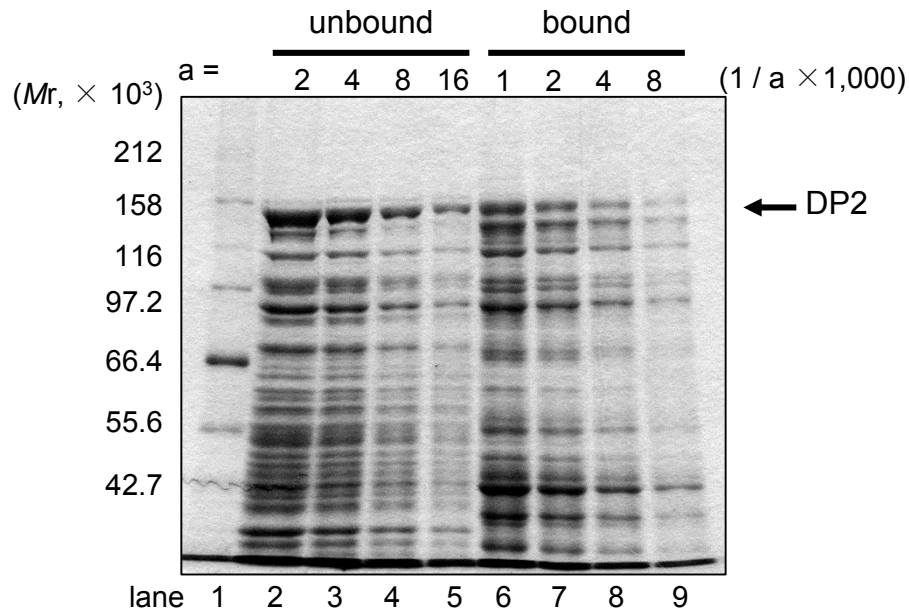
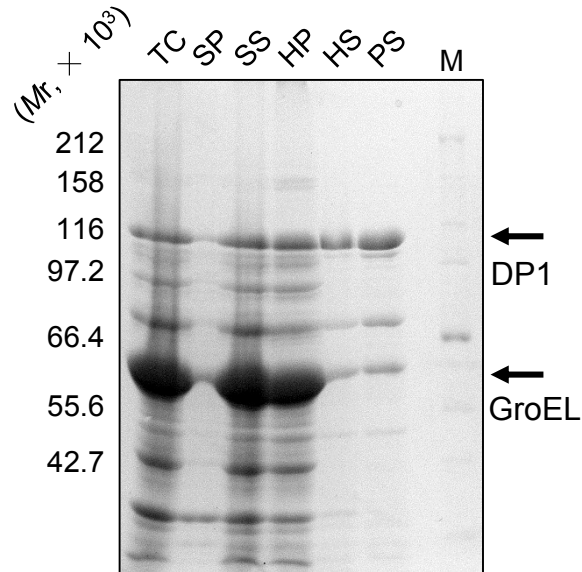


図 1-3 N-HAT-tagged TkoDP1およびN-HAT-tagged TkoDP2の粗精製

(a) HATタグのアミノ酸配列。(b) N-HAT-tagged TkoDP1タンパク質の粗精製。lane 1: 分子量マーカー (P7702) (New England Biolabo社)、lanes 2-5: 非結合画分、lanes 6-9: 結合画分。(c) N-HAT-tagged TkoDP2タンパク質の粗精製。lanes 1: 分子量マーカー (P7702)、lanes 2-5: 非結合画分、lanes 6-9: 結合画分。(b) (c) 分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1、TkoDP2が泳動された位置を図の右側に示した。図の上部に各画分全体の量に対するゲルに供した量の割合を示した。タンパク質はCoomasie Brilliant Blue (CBB) 染色により検出した。

(a)



(b)

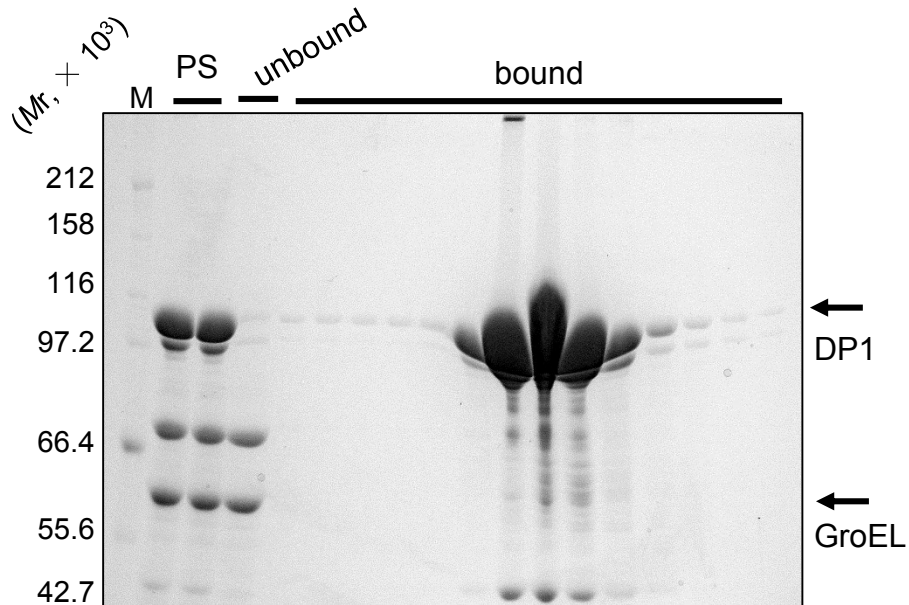


図 1-4 シャペロンと共産生させたC-His-tagged TkoDP1の粗精製

(a) C-His-tagged TkoDP1をシャペロンと共産生させ、各精製段階を分析した結果。(b) (a) のPS画分を硫酸アンモニウム沈殿した沈殿を再溶解させたものをHisTrap HP 1 mlカラムで精製した結果。各図に対して、分子量マーカの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1、GroELが泳動された位置を図の右側に示した。図の上部のunboundとboundは、非結合画分と結合画分をそれぞれ示している。M: 分子量マーカ (P7702)、TC: total cell、SP: sonication precipitant、SS: sonication supernatant、HP: heat precipitant、HS heat supernatant、PS: polyethyleneimin supernatant。タンパク質はCBB染色により検出した。

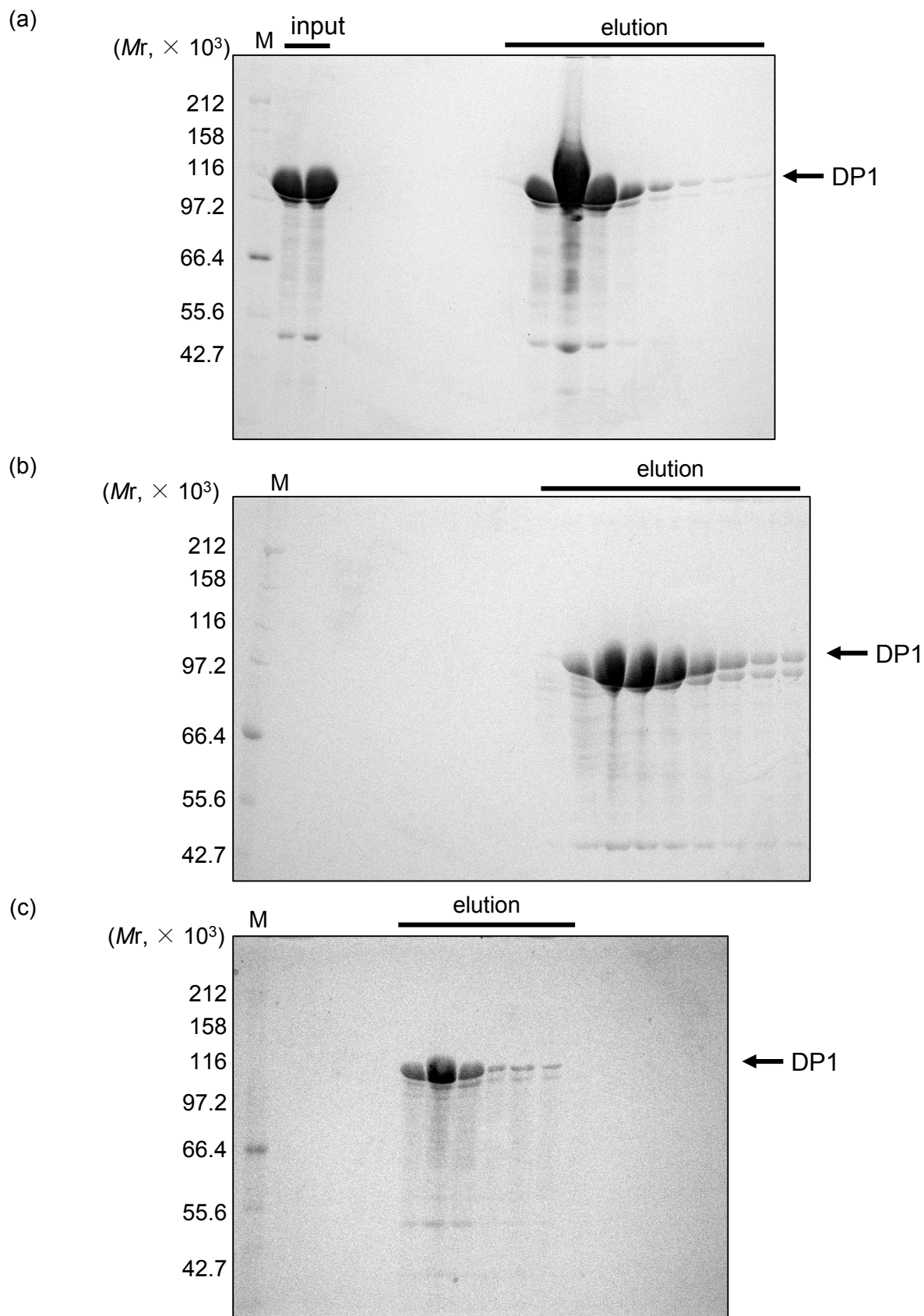


図 1-5 HisTrap HP 1 mlカラムに結合したC-His-tagged TkoDP1の精製条件検討

(a) His Trap HP 1 mlカラムの溶出画分をHiTrap Q HP 1 mlカラムで精製した結果。(b) (a) のHiTrap Q HP 1 mlカラムの溶出画分をHiTrap Phenyl HP 1 mlカラムで精製した結果。(c) (b) のHiTrap Phenyl HP 1 mlカラムの溶出画分をEcono-PAC® CHT-II cartridgeカラムで精製した結果。図の上部、M: 分子量マーカー (P7702)、input: カラムに供したタンパク質溶液、elution: 各カラムに結合したタンパク質の溶出画分、をそれぞれ示している。各図に対して、分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1が泳動された位置を図の右側に示した。タンパク質はCBB染色により検出した。

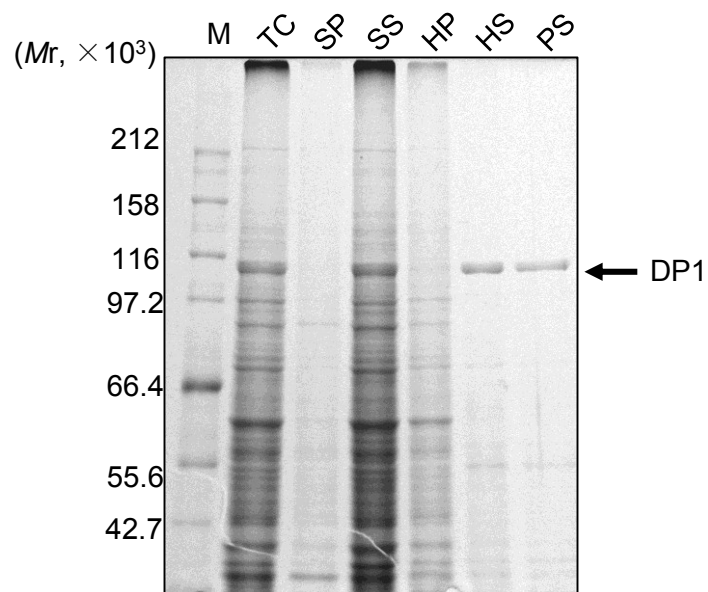


図 1-6 TkoDP1の粗精製

TkoDP1の粗精製段階の画分をSDS- 7.5% PAGEにより分析した結果。M: 分子量マーカー (P7702), TC: total cell, SP: sonication precipitation, SS: sonication supernatant, HP: heat precipitation, HS: heat supernatant, PS: polyethyleneimin supernatant。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1が泳動された位置を図の右側に示した。タンパク質はCBB染色により検出した。

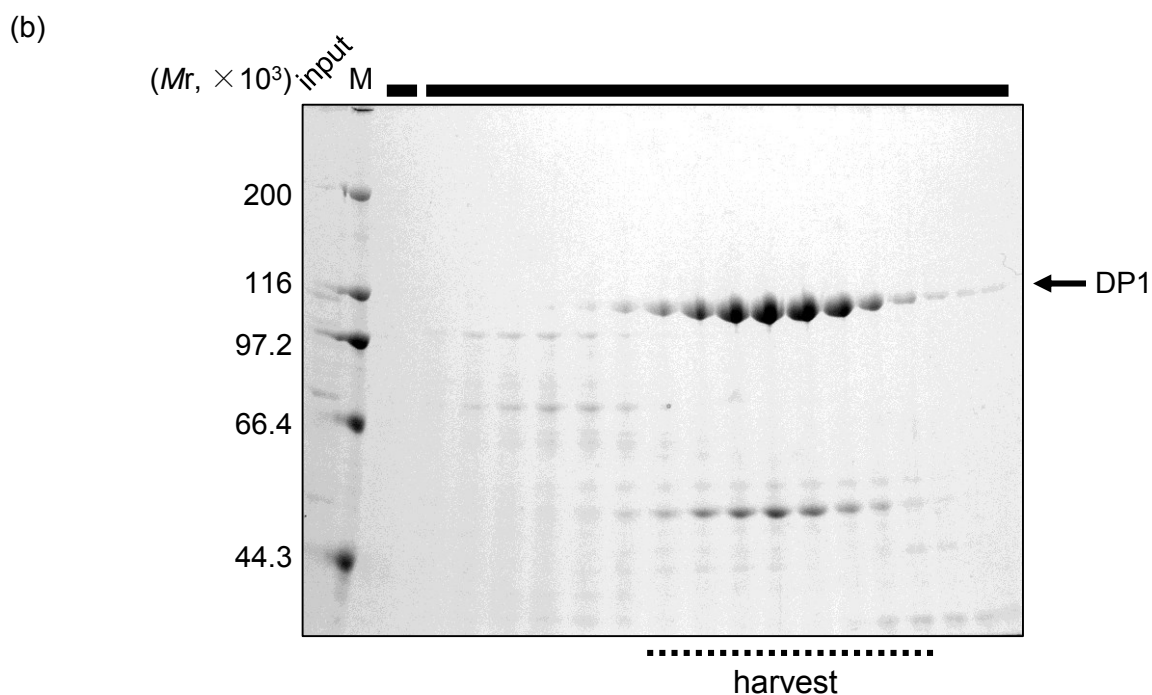
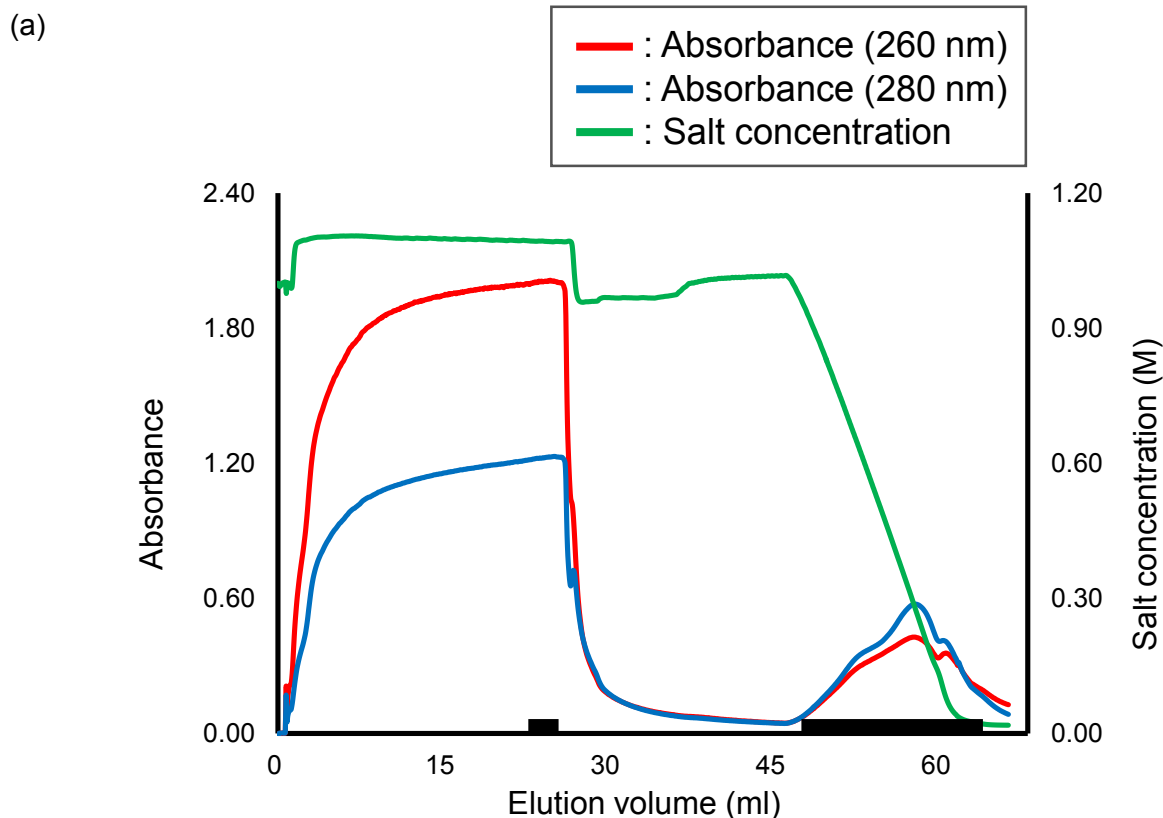


図 1-7 疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーによるTkoDP1の分画結果

TkoDP1のHiTrap Phenyl HP 1 mlカラムによる分画結果。(a) TkoDP1をHiTrap Phenyl HP 1 mlカラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) HiTrap Phenyl HP 1 mlカラムによるTkoDP1の分画をSDS-7.5%PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカー-T-P (タカラバイオ社)、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1が泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の破線は次の精製に用いた画分を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

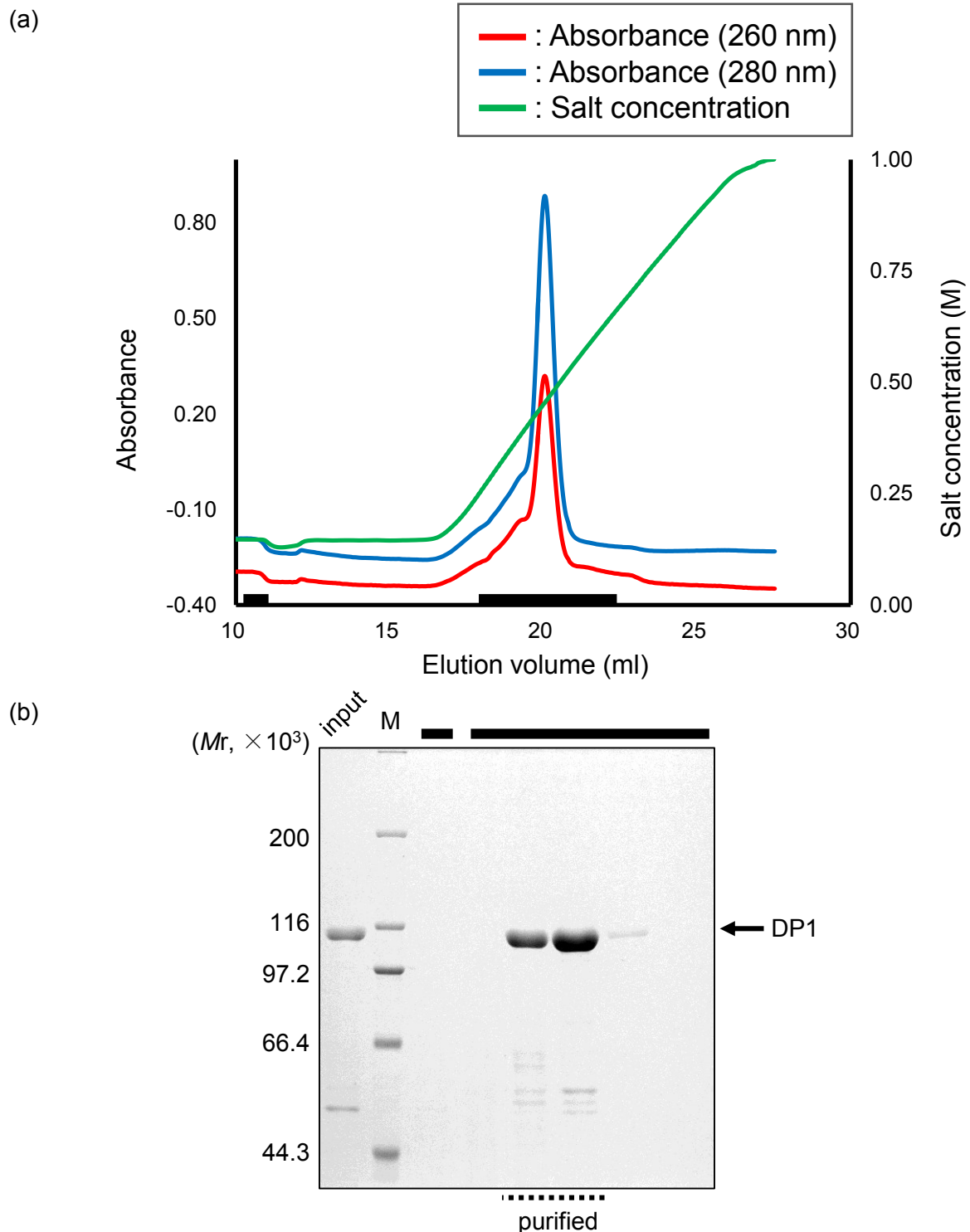


図 1-8 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるTkoDP1の分画結果

TkoDP1のHiTrap Q HP 1mlカラムによる分画結果。(a) TkoDP1をHiTrap Q HP 1mlカラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) HiTrap Q HP 1 mlカラムによるTkoDP1の分画をSDS- 7.5% PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカーT-P、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1が泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の破線はTkoDP1の最終精製画分を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

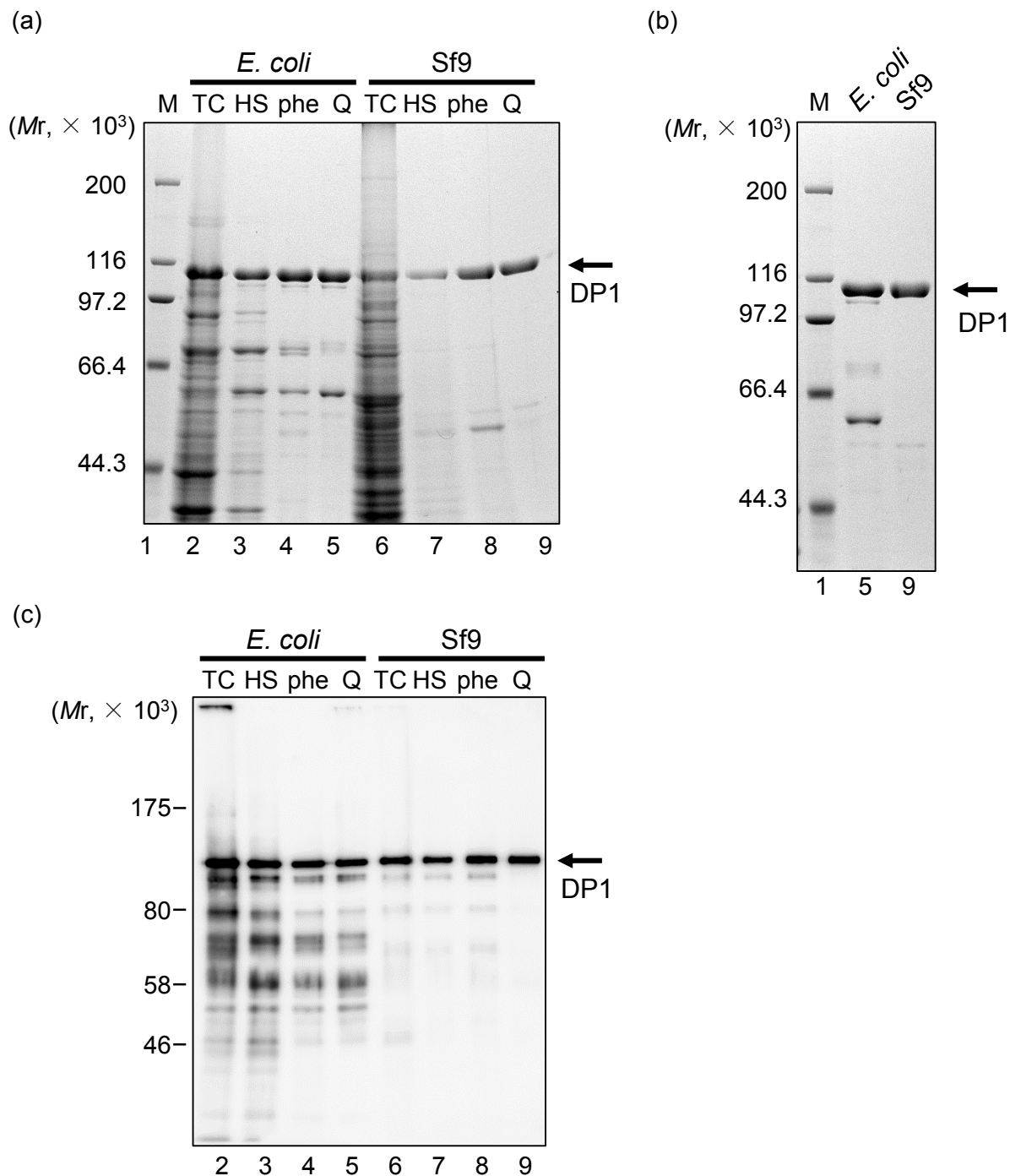


図 1-9 大腸菌または昆虫細胞で産生させたTkoDP1の精製純度の比較

(a) SDS-7.5% PAGEによる各精製段階の純度の比較。レーン4、5、8、9にはTkoDP1を25 pmol (2 µg) 供した。(b) 各宿主で産生させたTkoDP1の最終精製画分。(a) (b) の図の上部のM: 分子量マーカー (P7702)。タンパク質はCBB染色により検出した。(c) (a) の各精製段階をウェスタンブロッティングによって分析した結果。一次抗体には抗PfuDP1ウサギIgGを用いた。各レーンには (a) の100分の1の量を供した。図の左側は分子量マーカー (P7708) (New England Biolab社) の分子量を示した。各図において、TC: total cell、HS: heat supernatant、phe: HiTrap Phenyl HP 1 mlカラム溶出画分、Q: HiTrap Q HP 1 mlカラム溶出画分。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1が泳動された位置を図の右側に示した。

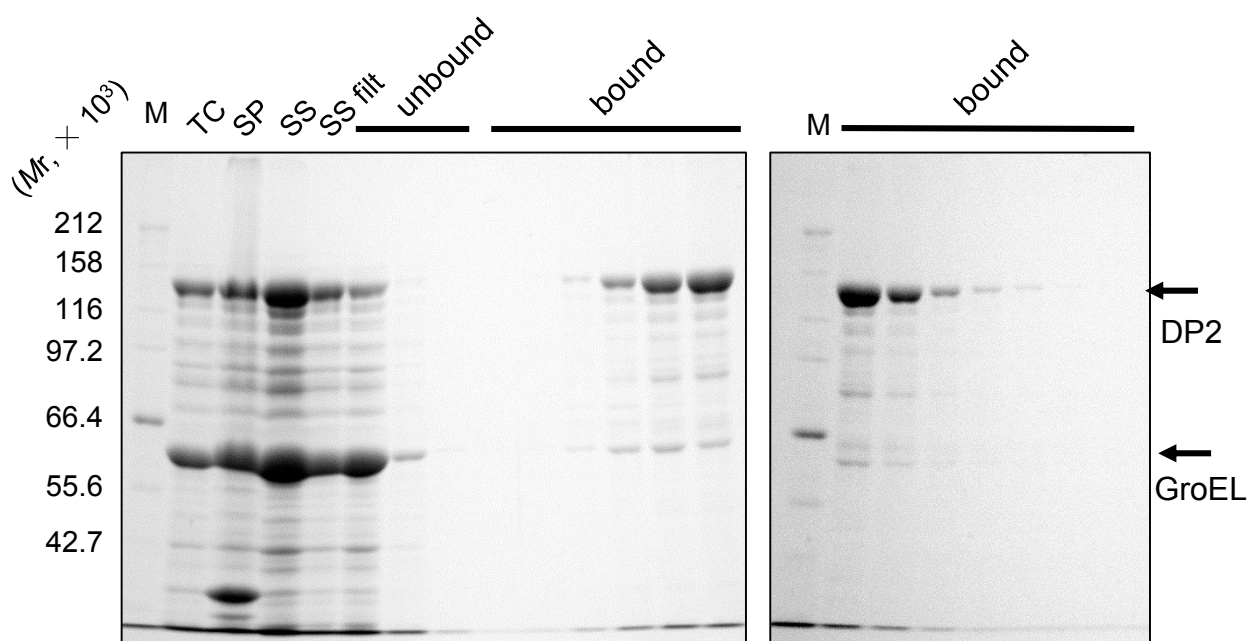


図 1-10 シャペロンと共産生させたC-His-tagged TkoDP2の粗精製

C-His-tagged TkoDP2をシャペロンと共産生させ、HisTrap HP 1 mlカラムで粗精製した結果。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP2、GroELが泳動された位置を図の右側に示した。図の上部のunboundとboundは、非結合画分と結合画分をそれぞれ示している。M: 分子量マーカー (P7702)、TC: total cell、SP: sonication precipitant、SS: sonication supernatant、SS filt: sonication supernatantを45 μ mのフィルターに通したもの。タンパク質はCBB染色により検出した。

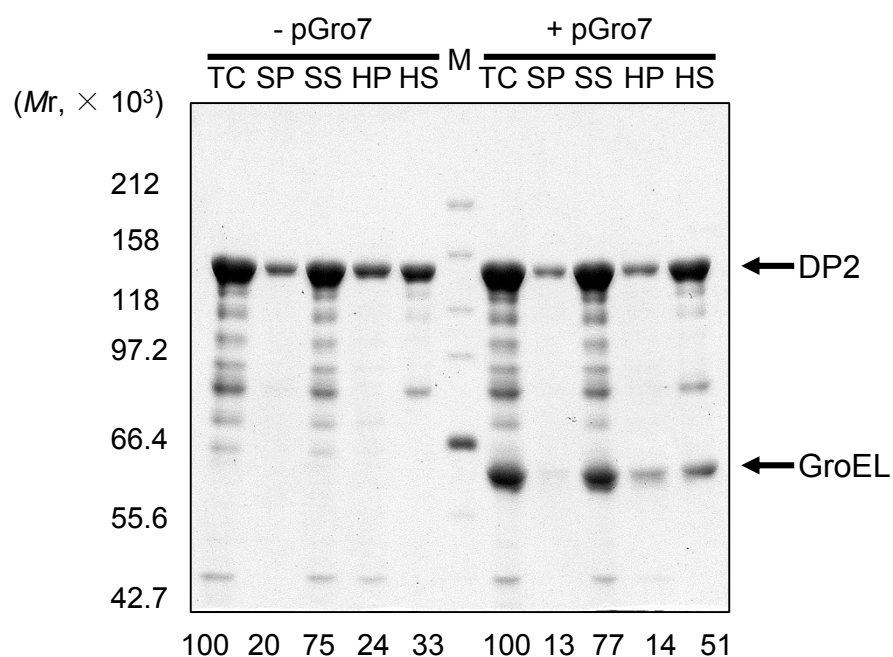


図 1-11 TkoDP2の精製条件の検討

TkoDP2を単独で産生させた場合、またはシャペロンと共産生させた場合の各精製段階の可溶化の比較。各条件とも同じ菌数の大腸菌 ($OD_{600} = 0.024$ 相当) から調製したサンプルを供した。M: 分子量マーカー (P7702)、TC: total cell、SP: sonication precipitation、SS: sonication supernatant、HP: heat precipitation、HS: heat supernatant。図の上部の“-pGro7”は“+pGro7”はそれぞれシャペロン非共産生または共産生の条件を示している。図の下部の数字は、各条件のTC画分のTkoDP2の量を100とした場合の各画分中のTkoDP2の相対量を示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側、TkoDP2とGroELが泳動された位置を図の右側に示した。タンパク質はCBB染色により検出した。

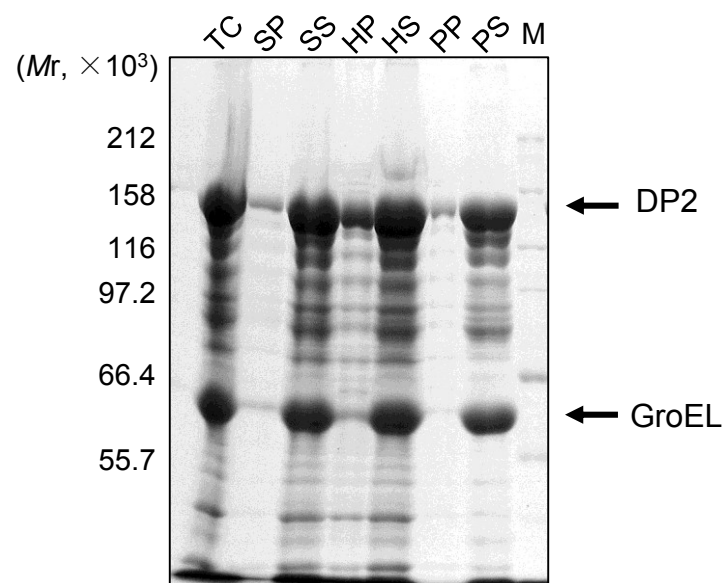


図 1-12 TkoDP2の粗精製

TkoDP2の粗精製段階の画分をSDS- 7.5% PAGEにより検定した結果。M: 分子量マーカー (P7702)、TC: total cell、SP: sonication precipitation、SS: sonication supernatant、HP: heat precipitation、HS: heat supernatant、PP: polyethyleneimin precipitation、PS: polyethyleneimin supernatant。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP2、GroELが泳動された位置を図の右側に示した。タンパク質はCBB染色により検出した。

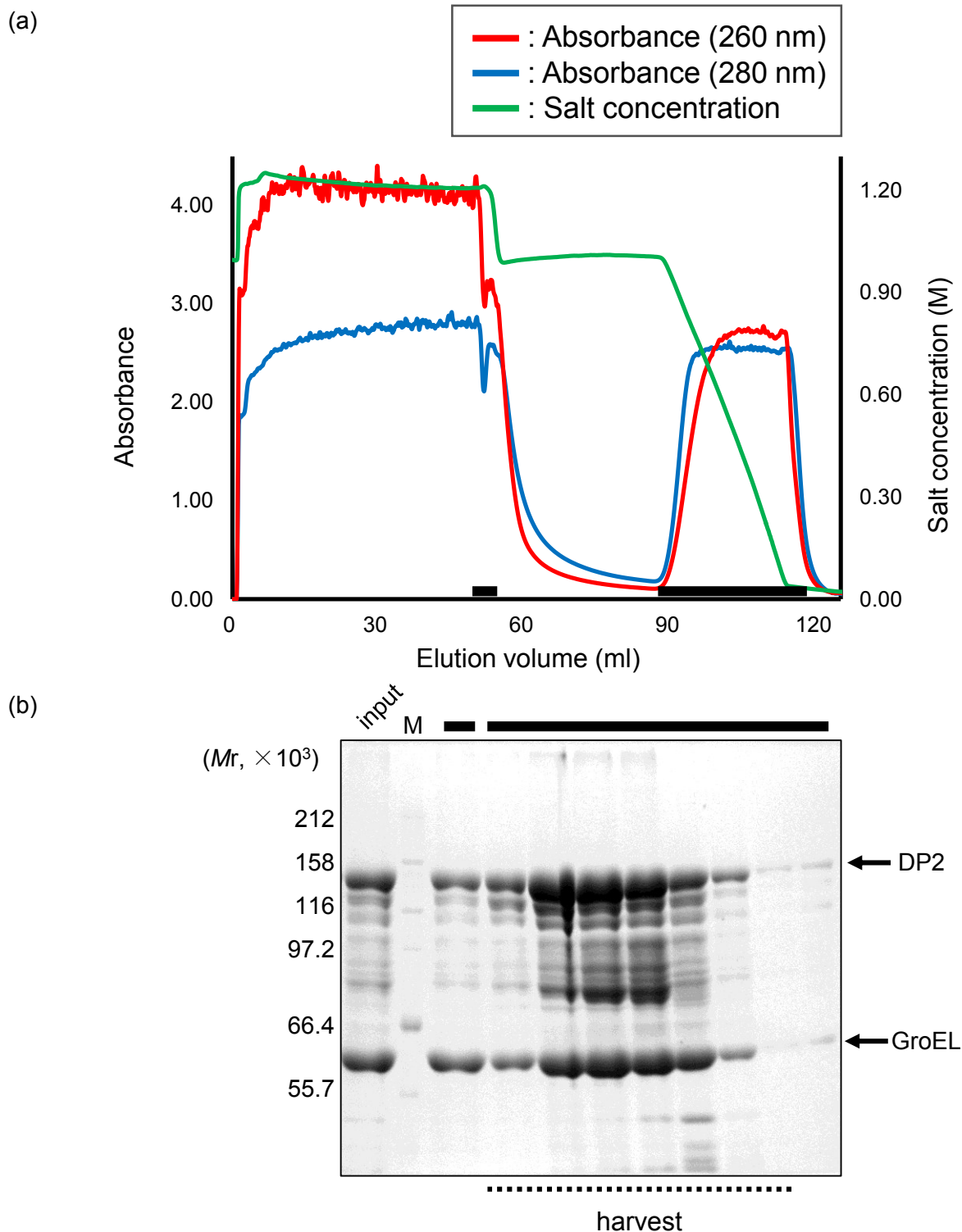


図 1-13 疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーによるTkoDP2の分画結果

TkoDP2のHiTrap Butyl HP 5 mlカラムによる分画結果。(a) TkoDP2をHiTrap Butyl HP 5 mlカラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) HiTrap Butyl HP 5 mlカラムによるTkoDP2の分画をSDS- 7.5% PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカー(P7702)、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP2、GroELが泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の破線は次の精製に用いた画分を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

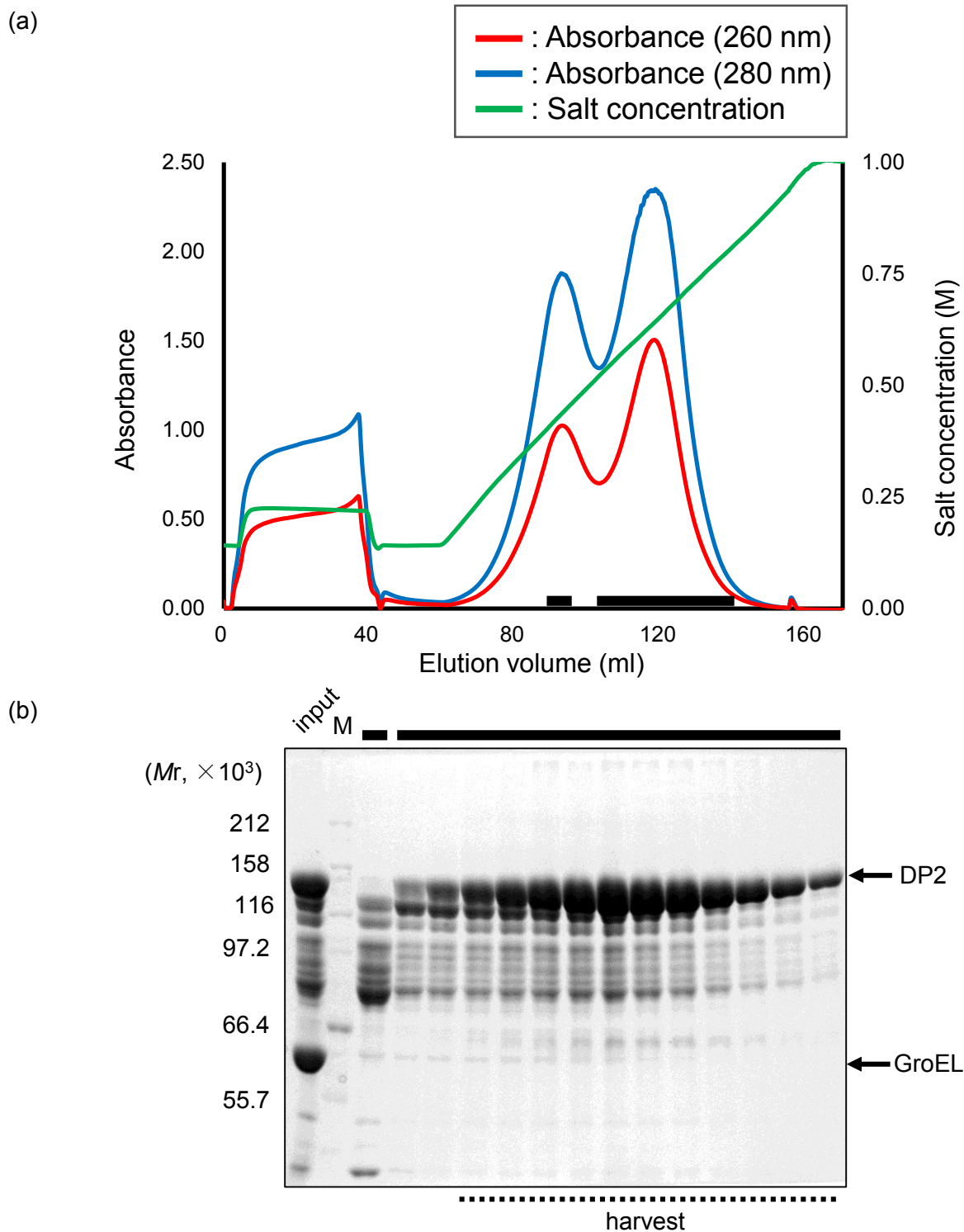


図 1-14 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによるTkoDP2の分画結果

TkoDP2のHiTrap Heparin HP 5 mlカラムによる分画結果。(a) TkoDP2をHiTrap Heparin HP 5 mlカラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) HiTrap Heparin HP 5 mlカラムによるTkoDP2の分画をSDS- 7.5% PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカー (P7702)、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP2、GroELが泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の破線は次の精製に用いた画分を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

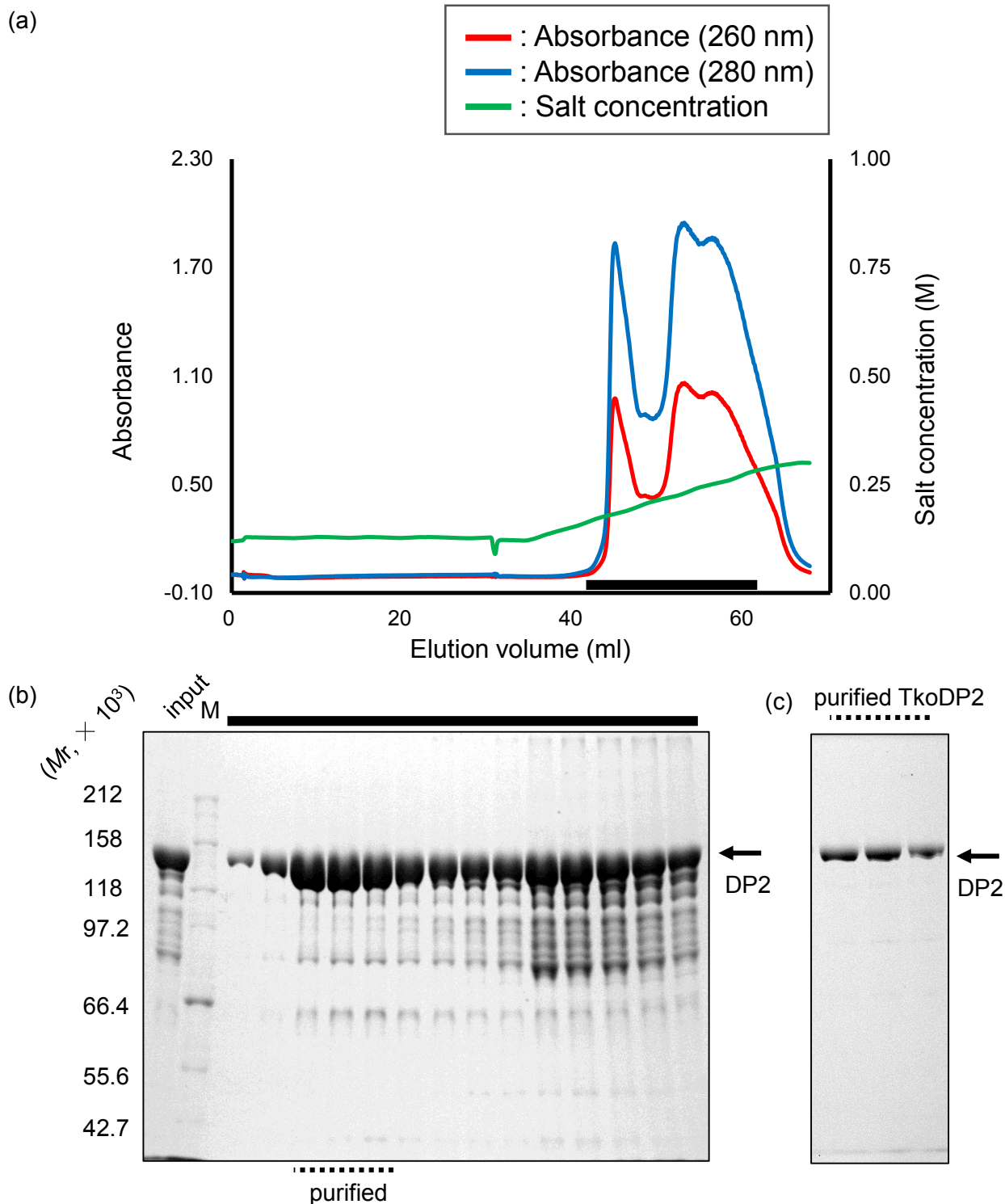


図 1-15 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるTkoDP2の分画結果

TkoDP2のENrich™ Q 5/50カラムによる分画結果。(a) TkoDP2をENrich™ Q 5/50カラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) ENrich™ Q 5/50カラムによるTkoDP2の分画をSDS- 7.5% PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカー (P7702)、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。図の下部の破線はTkoDP2の最終精製画分を示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP2が泳動された位置を図の右側に示した。タンパク質はCBB染色により検出した。(c) (b) の破線部の画分の5分の1量をSDS-7.5% PAGEで分析した結果。タンパク質はCBB染色により検出した。

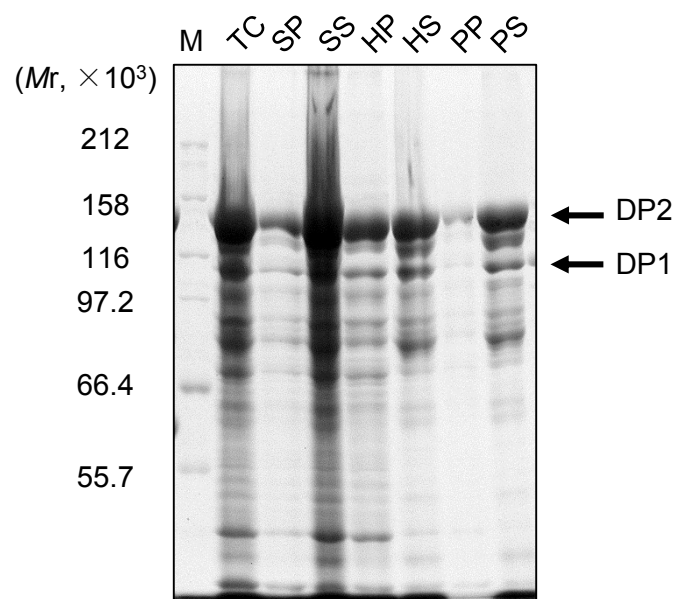


図 1-16 TkoPolDの粗精製

TkoPolDの粗精製段階の画分をSDS- 7.5% PAGEにより検定した結果。M: 分子量マーカー (P7702)、TC: total cell、SP: sonication precipitation、SS: sonication supernatant、HP: heat precipitation、HS: heat supernatant、PP: polyethyleneimin precipitation、PS: polyethyleneimin supernatant。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1、TkoDP2が泳動された位置を図の右側に示した。タンパク質はCBB染色により検出した。

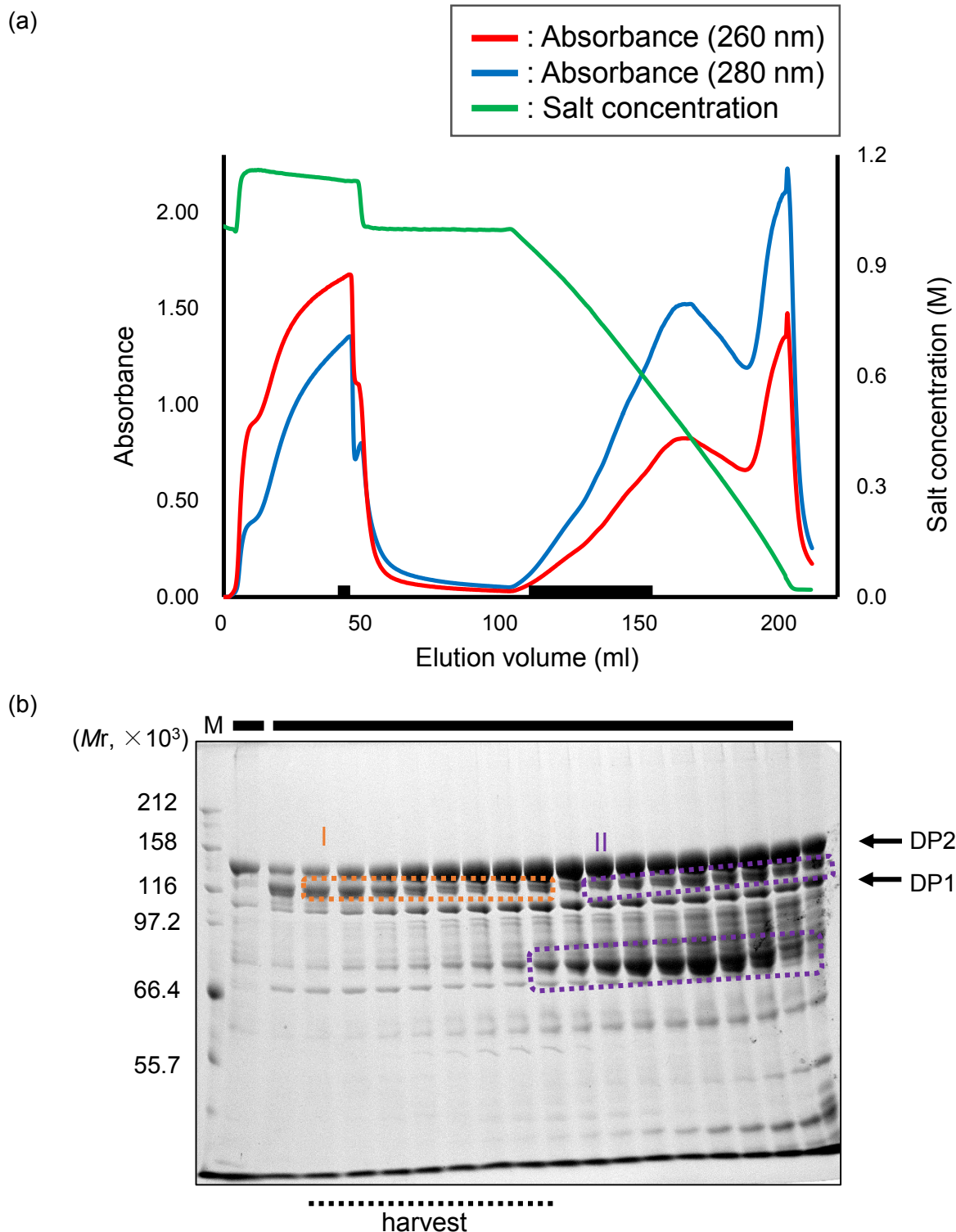


図 1-17 疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーによるTkoPolDの分画結果

TkoPolDのHiTrap Butyl HP 5 mlカラムによる分画結果。(a) TkoPolDをHiTrap Butyl HP 5 mlカラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) HiTrap Butyl HP 5 mlカラムによるTkoPolDの分画をSDS- 7.5% PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカー(P7702)、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。図中の破線I (橙)、II (紫) は後のカラム精製で挙動に差があるバンドのグループを示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1、TkoDP2が泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の破線は次の精製に用いた画分を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

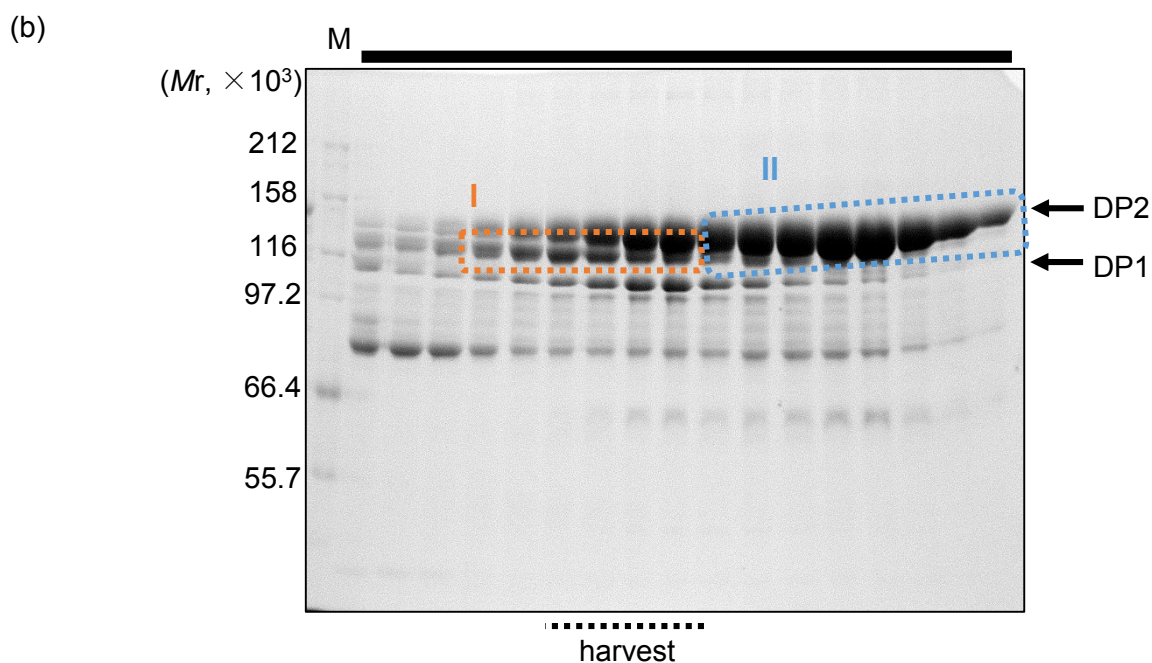
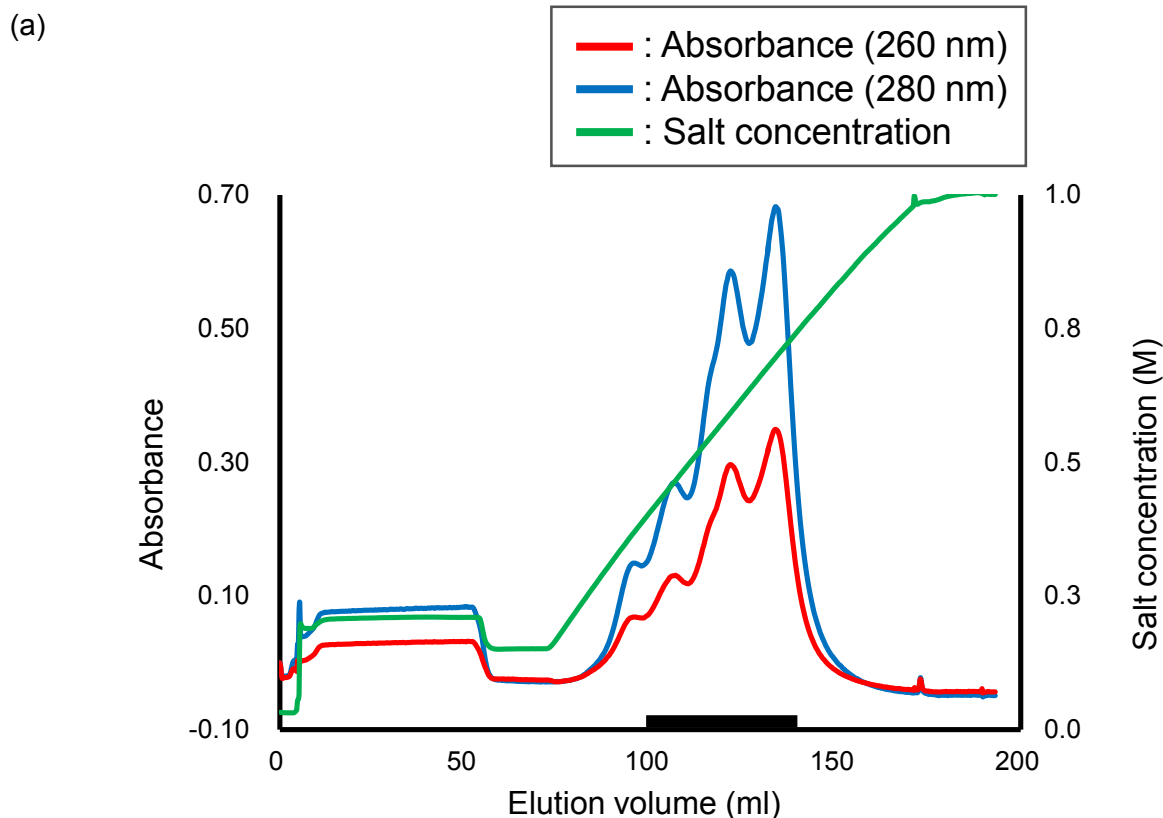


図 1-18 アフィニティーカラムクロマトグラフィーによるTkoPolDの分画結果

TkoPolDのHiTrap Heparin HP 5 mlカラムによる分画結果。(a) TkoPolDをHiTrap heparin HP 5 mlカラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) HiTrap Heparin HP 5 mlカラムによるTkoPolDの分画をSDS- 7.5% PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカー (P7702)、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。図中の破線I (橙), II (青) は後のカラム精製の挙動の差やTkoPolDの精製純度から分類したバンドのグループを示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1、TkoDP2が泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の破線は次の精製に用いた画分を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

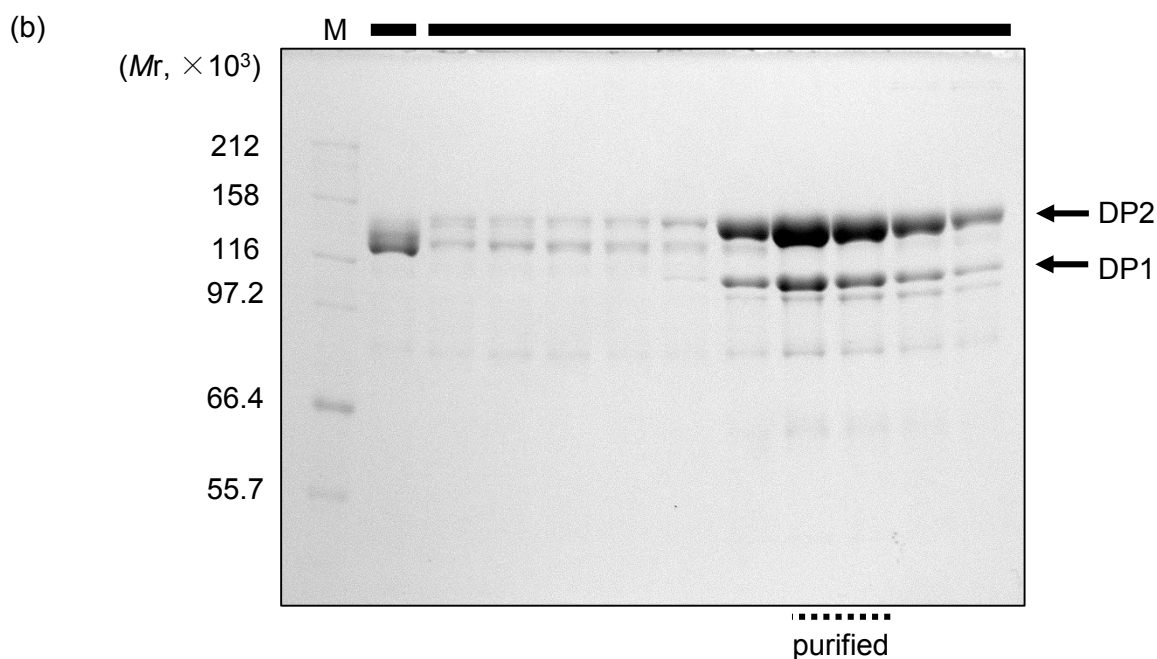
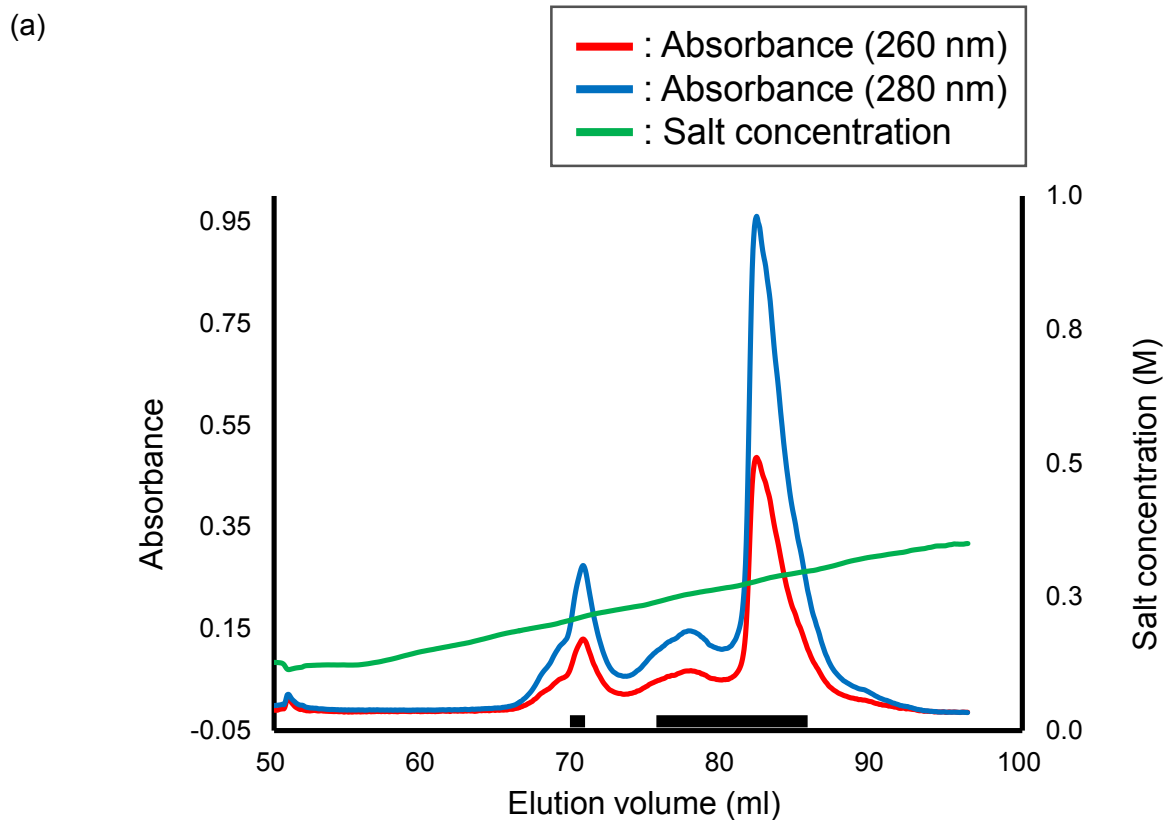


図 1-19 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによるTkoPolDの分画結果

TkoPolDのENrich™ Q 5/50カラムによる分画結果。(a) TkoPolDをENrich™ Q 5/50カラムを用いて分画したクロマトグラム。図下部の横棒はSDS-PAGEで分析した画分を示している。(b) ENrich™ Q 5/50カラムによるTkoPolDの分画をSDS- 7.5% PAGEによって分析した結果。図の上部、M: 分子量マーカー (P7702)、横棒: (a)の横棒部分との対応、をそれぞれ示している。分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、 TkoDP1、TkoDP2が泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の破線はTkoPolDの最終精製画分を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

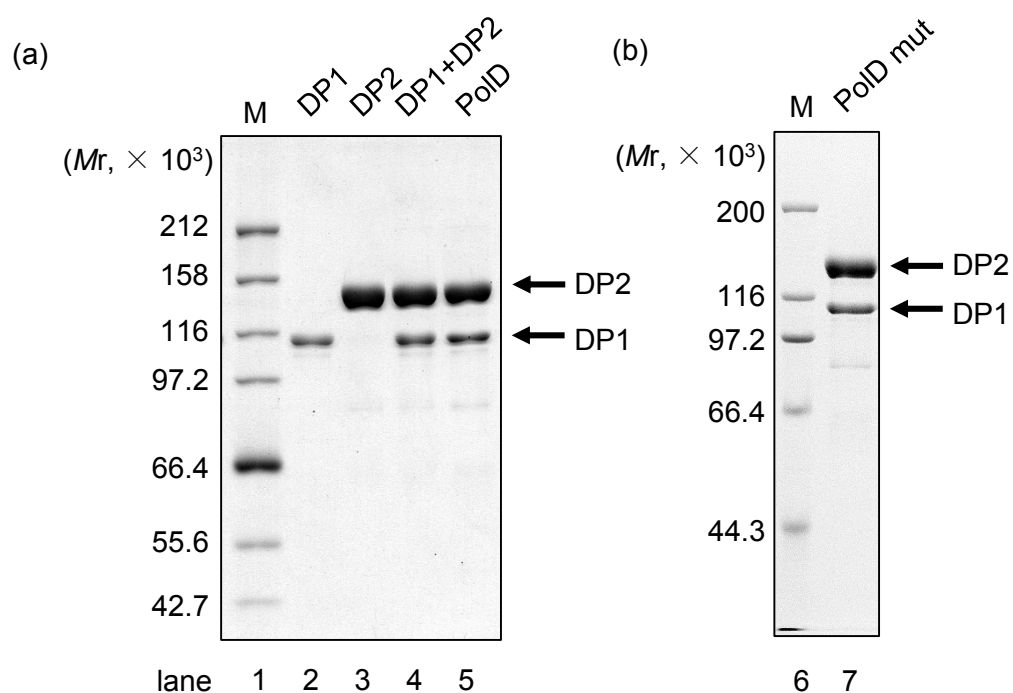


図 1-20 精製タンパク質の純度検定

精製したタンパク質をSDS-7.5% PAGEで分析した結果。(a) TkoDP1、TkoDP2、再構成TkoDP1+DP2、TkoPolDをSDS- 7.5% PAGEで分析した結果。図の上部に各レーンに供したタンパク質を示した。M: 分子量マーカー (P7702)。(b) 変異体TkoPolDをSDS- 7.5% PAGEで分析した結果。図の上部に各レーンに供したタンパク質を示した。M: 分子量マーカーT-P。それぞれ12 pmolに相当するタンパク質量をゲルに供した。各図について、分子量マーカーの各バンドの分子量を図の左側に、TkoDP1、TkoDP2が泳動された位置を図の右側に示した。図の下部の数字はレーン番号を示している。タンパク質はCBB染色により検出した。

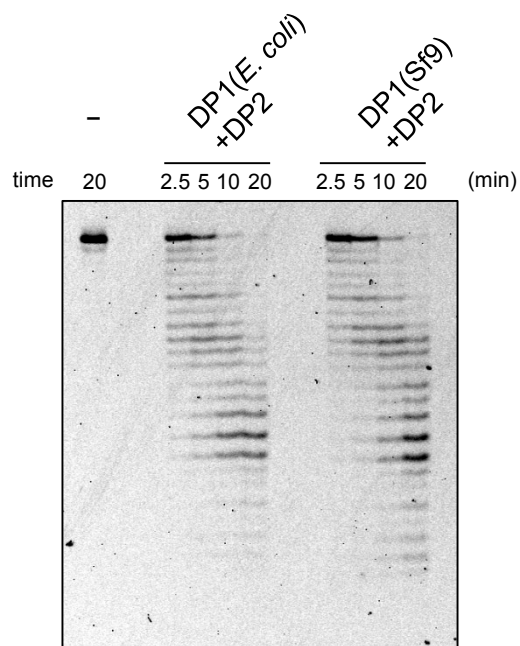


図 1-21 大腸菌で産生させたTkoDP1と昆虫細胞で産生させたTkoDP1の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の比較

大腸菌で産生させたTkoDP1または昆虫細胞で産生させたTkoDP1とTkoDP2を再構成させたそれぞれの再構成TkoDP1+DP2の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を比較した結果。図の上部に用いたタンパク質を示し、“-”はタンパク質を添加しない条件を示している。数字は反応時間を示している。反応産物は8 M 尿素を含んだ変性ゲル電気泳動によって分析した。

表 2-1 使用した基質DNAの配列

ssDNA	5'Cy5-pri32	5' Cy5- CGAACTGCCCTGGAATCCTGA CGACATGTAGCG- 3'
dsDNA	5'Cy5-pri32 + rc32	5' Cy5- CGAACTGCCCTGGAATCCTGA CGACATGTAGCG- 3' 3'- GCTTGACGGA CCTTAGGACTGCTGTACATC GC- 5'
primed DNA	5'Cy5-pri32 + temp45	5' Cy5- CGAACTGCCCTGGAATCCTGA CGACATGTAGCG- 3' 3'- GCTTGACGGA CCTTAGGACTGCTGTACATC GCTTGCTAGTGGAGT- 5'
primed DNA -1MM	5'Cy5-pri32 + temp45_14T	5' Cy5- CGAACTGCCCTGGAATCCTGA CGACATGTAGCG- 3' 3'- GCTTGACGGA CCTTAGGACTGCTGTACATC GTTTGCTAGTGGAGT- 5'
primed DNA -2MM	5'Cy5-pri32 + temp45_14TT	5' Cy5- CGAACTGCCCTGGAATCCTGA CGACATGTAGCG- 3' 3'- GCTTGACGGA CCTTAGGACTGCTGTACATC TTTTGCTAGTGGAGT- 5'
primed DNA -3MM	5'Cy5-pri32 + temp45_14TTT	5' Cy5- CGAACTGCCCTGGAATCCTGA CGACATGTAGCG- 3' 3'- GCTTGACGGA CCTTAGGACTGCTGTACATT TTTTGCTAGTGGAGT- 5'

表 2-2 ヌクレオチド取込み活性の測定値

protein	Specific activity (unit/nmol)	Specific activity (unit/mg)
TkoDP1	<i>ND</i>	<i>ND</i>
TkoDP2	<i>ND</i>	<i>ND</i>
TkoDP1+DP2	11,000 ± 700	49,000 ± 3,000
TkoPolD	13,000 ± 1,000	55,000 ± 4,400
TkoPolB	22,000 ± 2,200	240,000 ± 24,000
PfuPolB	10,000 ± 720	110,000 ± 8,000

ND: not detected

表の値は3回以上の測定から算出した「平均値±標準誤差」を表している。
有効数字は二桁である。

表 2-3 DNA-タンパク質間の解離定数

DNA	TkoDP1 K_D (nM)	TkoDP2 K_D (nM)	TkoDP1+DP2 K_D (nM)	TkoPolD K_D (nM)
ssDNA	<i>ND</i>	70 ± 14	270 ± 65	280 ± 91
dsDNA	<i>ND</i>	9.2 ± 2.3	29 ± 3.1	16 ± 4.1
primed DNA	<i>ND</i>	3.7 ± 0.48	16 ± 4.9	7.0 ± 0.52

ND: not detected

表の値は4回以上の測定から算出した「平均値 $\pm$ 標準誤差」を表している。
有効数字は二桁である。

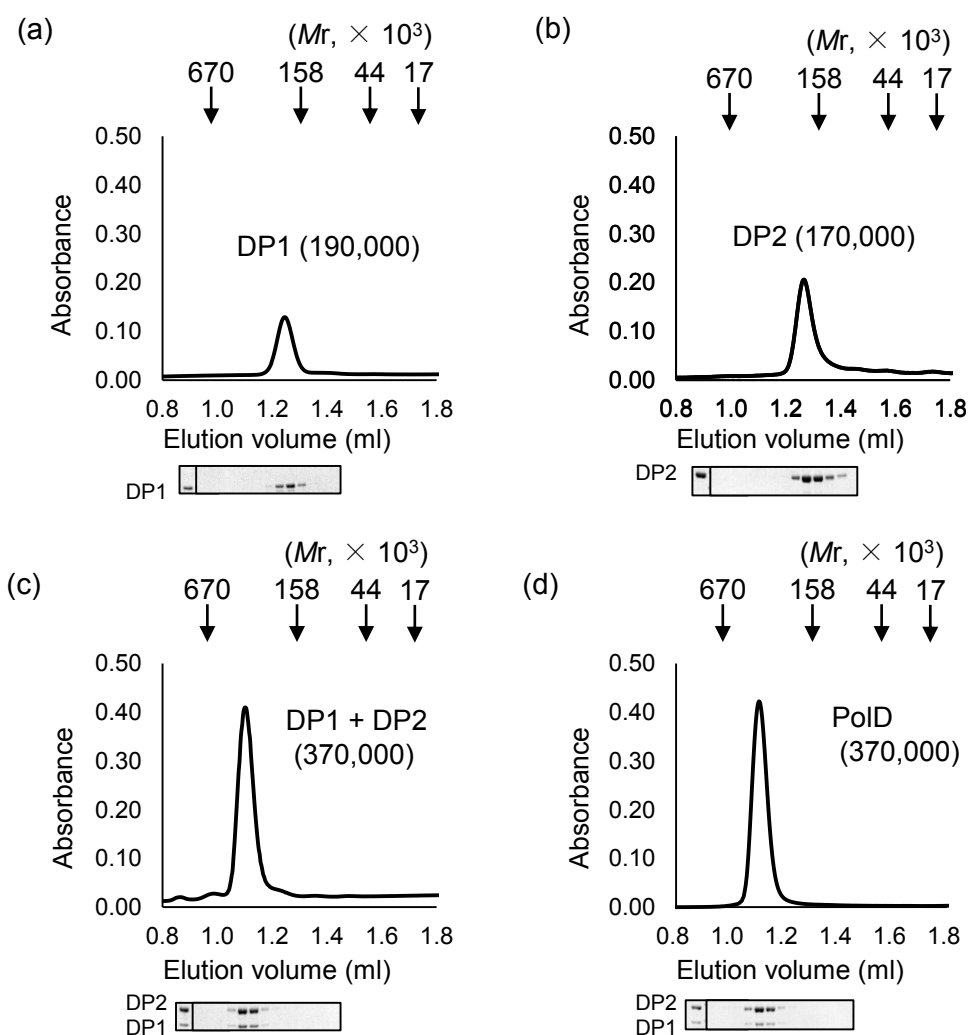


図 2-1 ゲルろ過クロマトグラフィーによる多量体構造の解析

(a) TkoDP1、(b) TkoDP2、(c) TkoDP1+DP2、(d) TkoPolDをゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより分析したクロマトグラム。グラフの縦軸は280 nmの波長における吸光度、横軸は溶出体積を示している。図の上部にある矢印と数字は、分子量マーカータンパク質の溶出位置とそれぞれの分子量を表している。各グラフの下に、グラフの溶出体積に対応するSDS-7.5% PAGEの結果を示した。タンパク質はCBB染色により検出した。

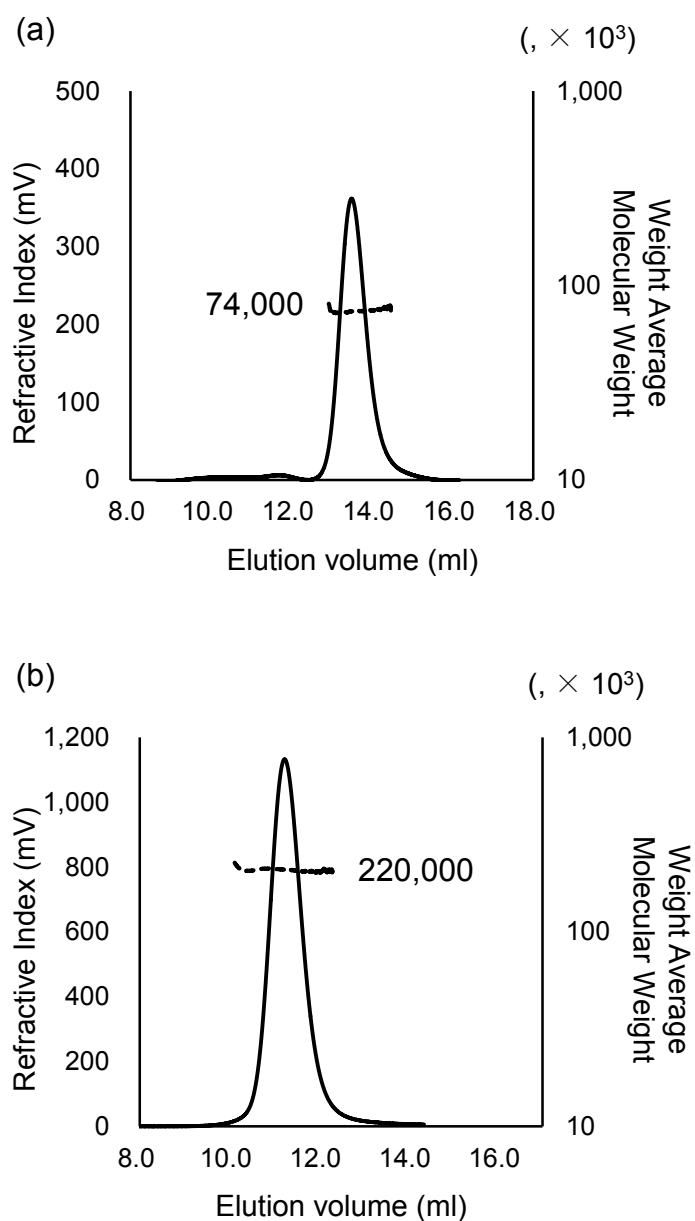


図 2-2 静的光散乱による多量体構造の解析

ゲルろ過カラムクロマトグラフィーのクロマトグラムとその溶出面分の絶対分子量を測定した結果。(a) TkoDP1のクロマトグラムと絶対分子量の測定結果。(b) TkoPolDのクロマトグラムと絶対分子量の測定結果。グラフの左の縦軸は示唆屈折率を、右の縦軸は絶対分子量の対数を、横軸は溶出体積を表している。グラフ中の破線は絶対分子量を示し、数字はその測定値を表している。

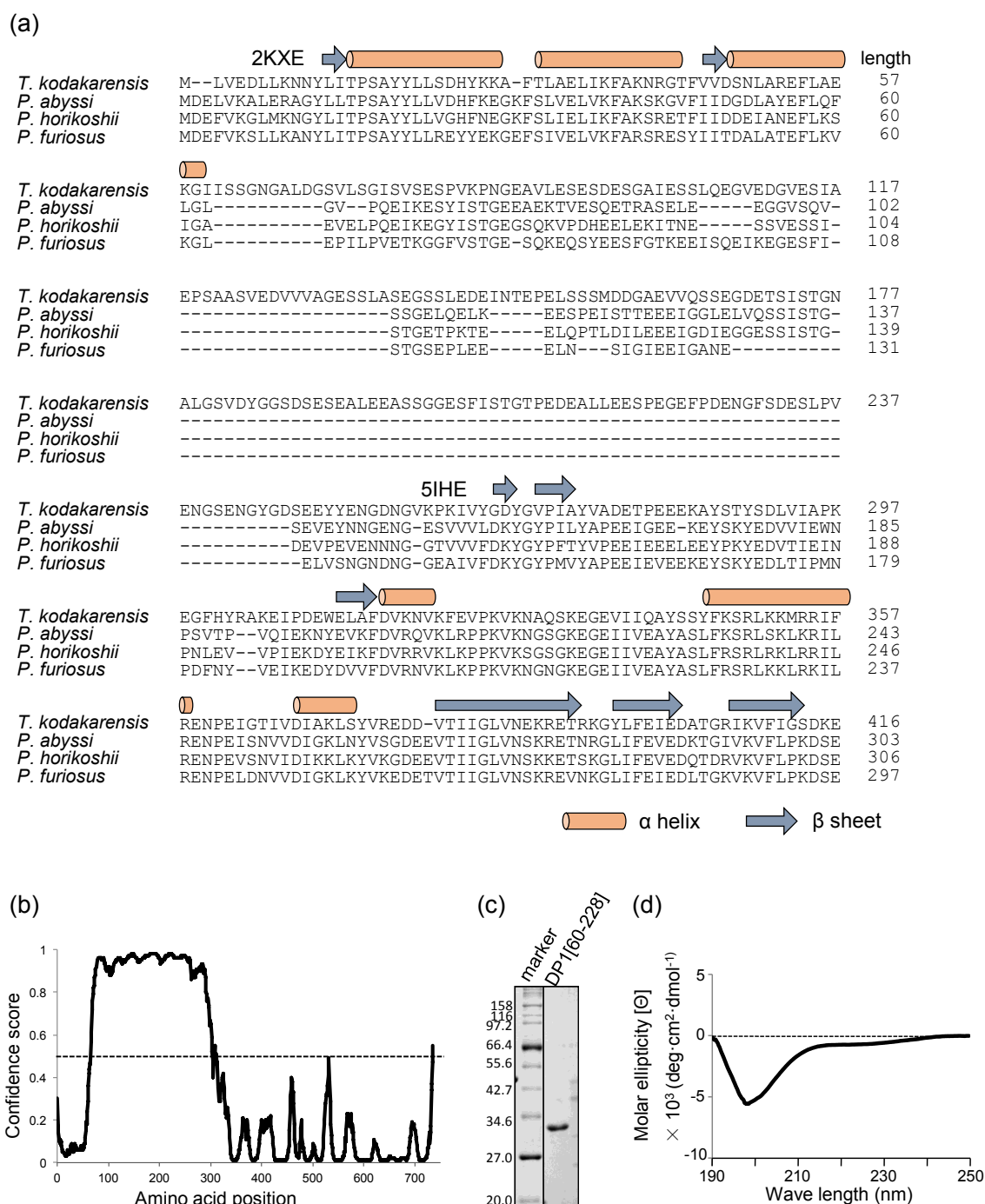


図 2-3 TkoDP1のN末端領域の構造情報

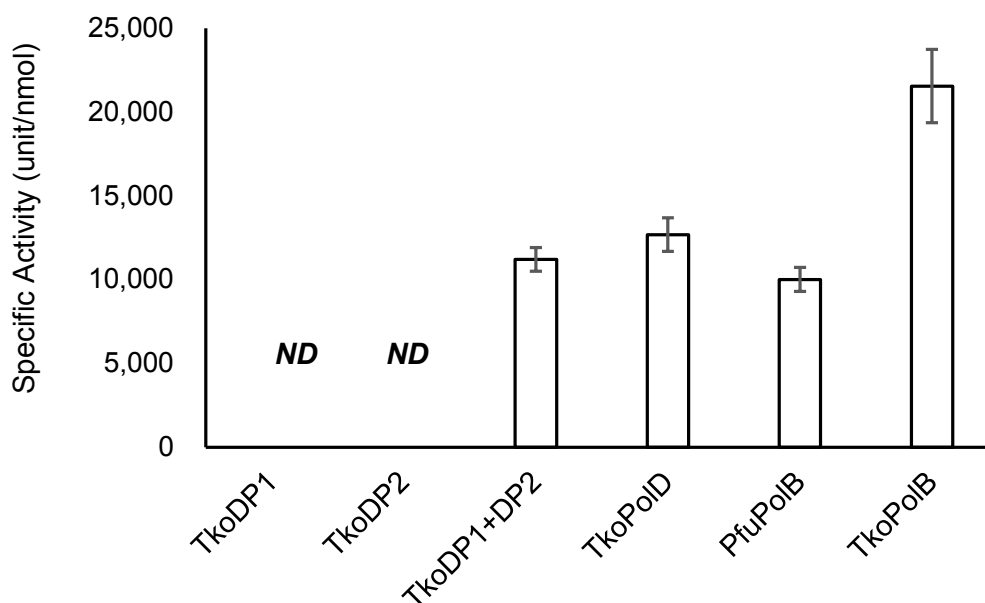
(a) Thermococcales目のファミリーD DNAポリメラーゼ小サブユニットのN末端領域のアミノ酸配列のアライメント。*T. kodakarensis* (WP_011250853)、*P. abyssi* (WP_010867245)、*P. horikoshii* (WP_010884237)、*P. furiosus* (WP_011011130)。アライメントはMAFFTを用いて作成した。二次構造はPhoDP1(1-72)とPabDP1(144-303)を参考にした。PDB IDは図中に示している。

(b) DISOPRED3 によるTkoDP1の変性領域の予測。破線より上が変性している状態を示している。

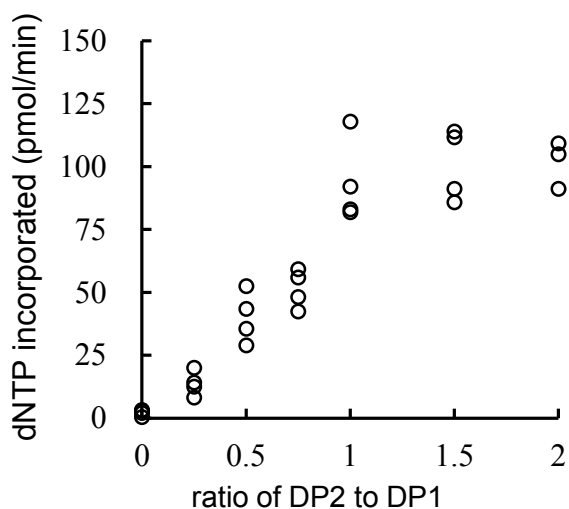
(c) His-tagged TkoDP1(60-228) のSDS- 12.5% PAGEでの分析結果。

(d) Far-UV CDスペクトルの結果。

(a)



(b)



(c)

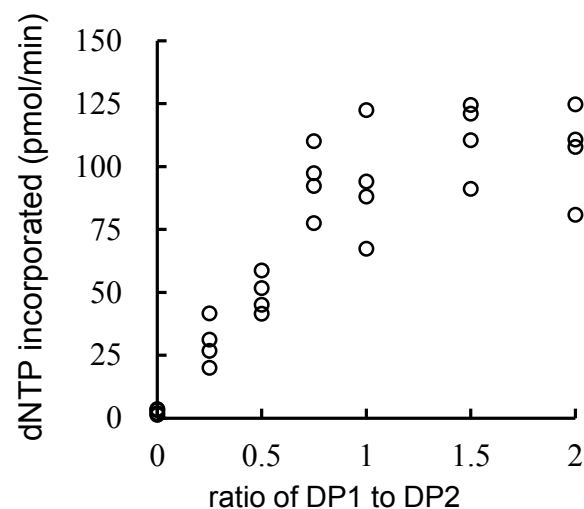


図 2-4 ヌクレオチド取込み活性

ヌクレオチド取込み活性の測定値から比活性を算出した結果。(a) TkoDP1、TkoDP2、TkoDP1+DP2、TkoPolD、PfuPolB、TkoPolBの比活性。各測定は3回以上行った。ヒストグラム上部の棒は標準誤差を示している。ND: not detected。(b) 一定量のTkoDP1に様々な濃度のTkoDP2を添加してヌクレオチド取込み活性を測定した結果。グラフの縦軸は単位時間当たりに入込んだdNTPの量を、横軸はTkoDP1に対するTkoDP2の物質量の比を示している。(c) 一定量のTkoDP2に様々な濃度のTkoDP1を添加してヌクレオチド取込み活性を測定した結果。グラフの縦軸は単位時間当たりに入込んだdNTPの量を、横軸はTkoDP2に対するTkoDP1の物質量の比を示している。(b) (c) 各測定は4回行い、各測定の結果を円で示している。

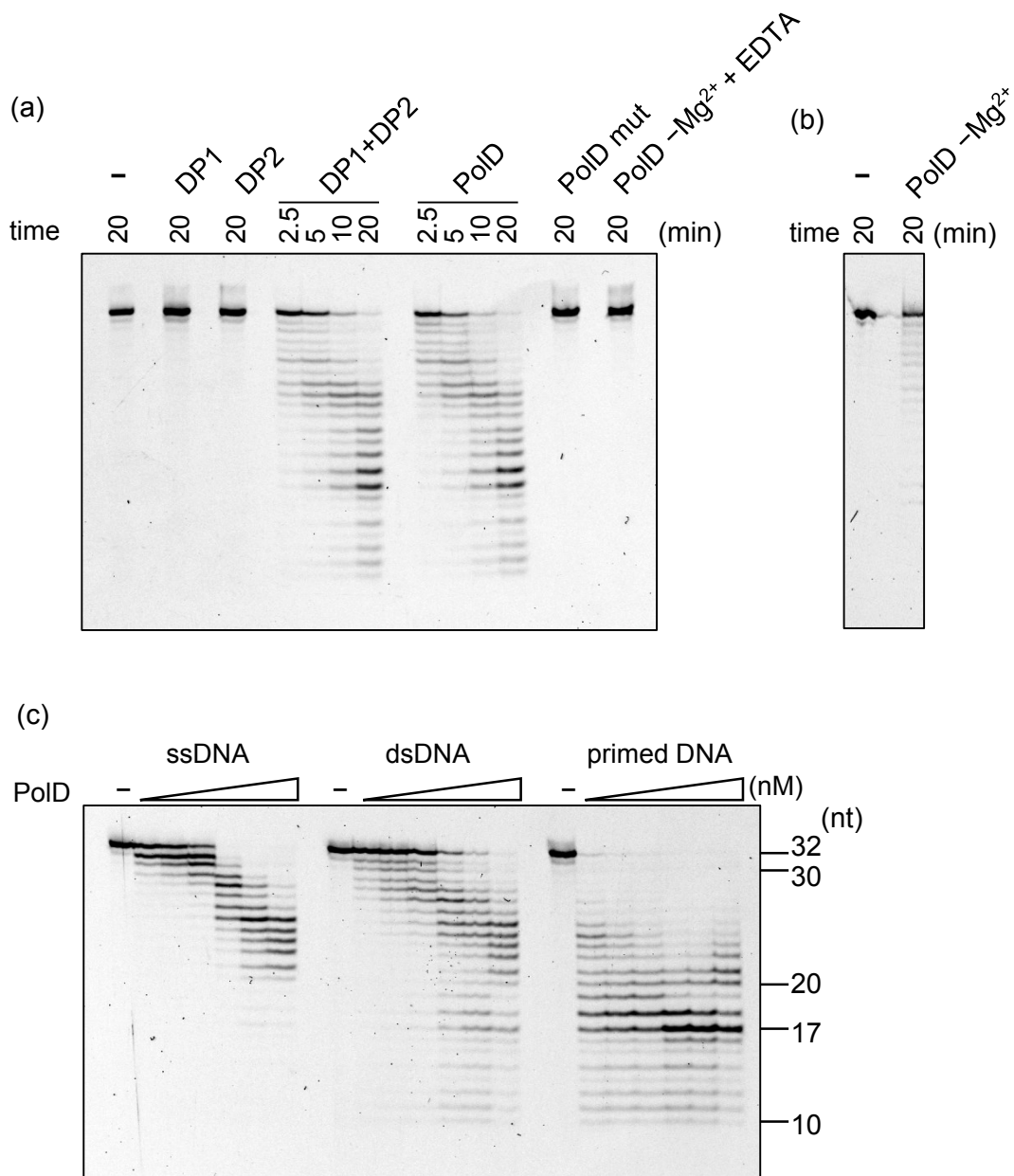


図 2-5 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性

(a) 精製した各タンパク質の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の検出結果。図の上部に反応に用いたタンパク質を示した。"-" はタンパク質を添加していないことを示している。PolD(mut) は TkoDP1(D473A H475A) と TkoDP2 を共産生させたタンパク質。PolD -Mg²⁺ + EDTA はマグネシウムイオンを含まない反応溶液に100 mM EDTAを添加した条件を示している。数字は反応時間を示している。(b) 二価金属イオンとEDTAを添加しない条件でのTkoPolDの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性。(c) 三種類のDNA基質に対するTkoPolDの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の検出結果。図の上部に反応に用いた各基質の種類を示している。三角形は反応に用いたTkoPolDの濃度 (5, 10, 20, 50, 100, 400) を示している。図の右側の数字は、その位置に泳動された反応産物の長さを示している。(a) (b) とともに反応産物は8 Mの尿素を含む変性ゲル電気泳動によって分析した。

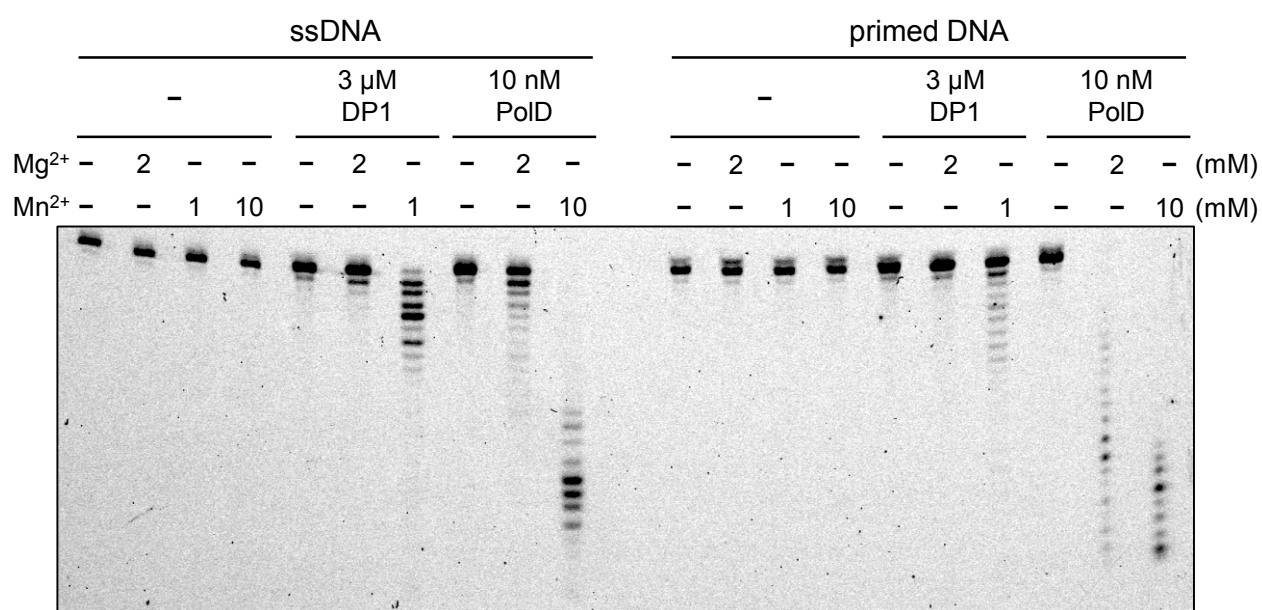


図 2-6 二価金属イオンの種類による3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の差

図の上部最上段に使用した基質DNAの種類を示した。上部中段に、反応に使用したタンパク質とその濃度を示した。"-"はタンパク質を添加していない条件を示している。上部下段の数字は反応系に含まれているマグネシウムイオンまたはマンガンイオンの濃度を表している。反応産物は8 Mの尿素を含む変性ゲル電気泳動で分析した。

PolD	-	10	-	10	-	10	-	10	(nM)
Mg ²⁺	2	2	100	100	-	-	100	100	(mM)
Mn ²⁺	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.1	(mM)
time	20	2.5 5 10 20	20	2.5 5 10 20	20	2.5 5 10 20	20	2.5 5 10 20	(min)

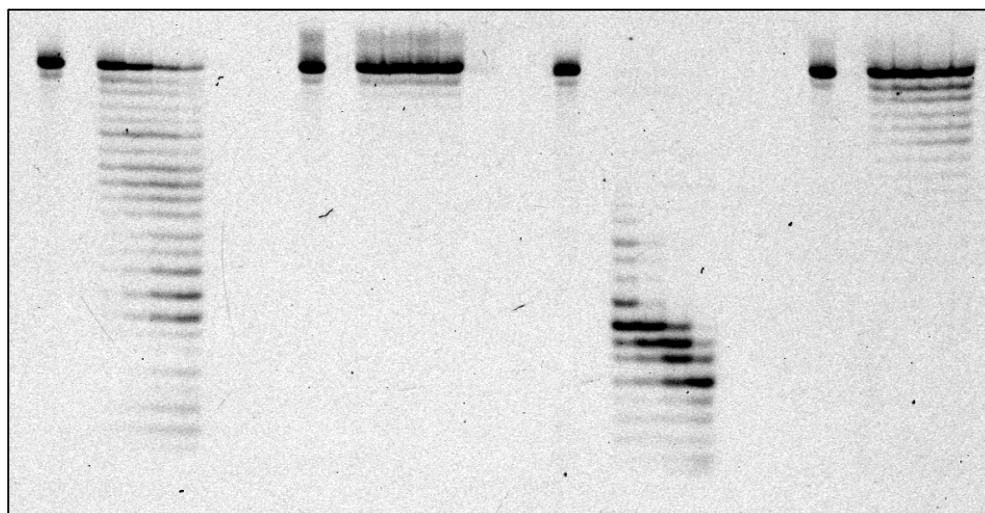


図 2-7 生体内二価金属イオン濃度での3'-5'エキソヌクレアーゼ活性

図の上部のPolD、Mg²⁺、Mn²⁺の行の数字は、反応に使用したそれぞれのタンパク質または二価金属イオンの濃度を示している。上下段のtimeの行の数字は反応時間を表している。反応産物は8 Mの尿素を含む変性ゲル電気泳動で分析した。

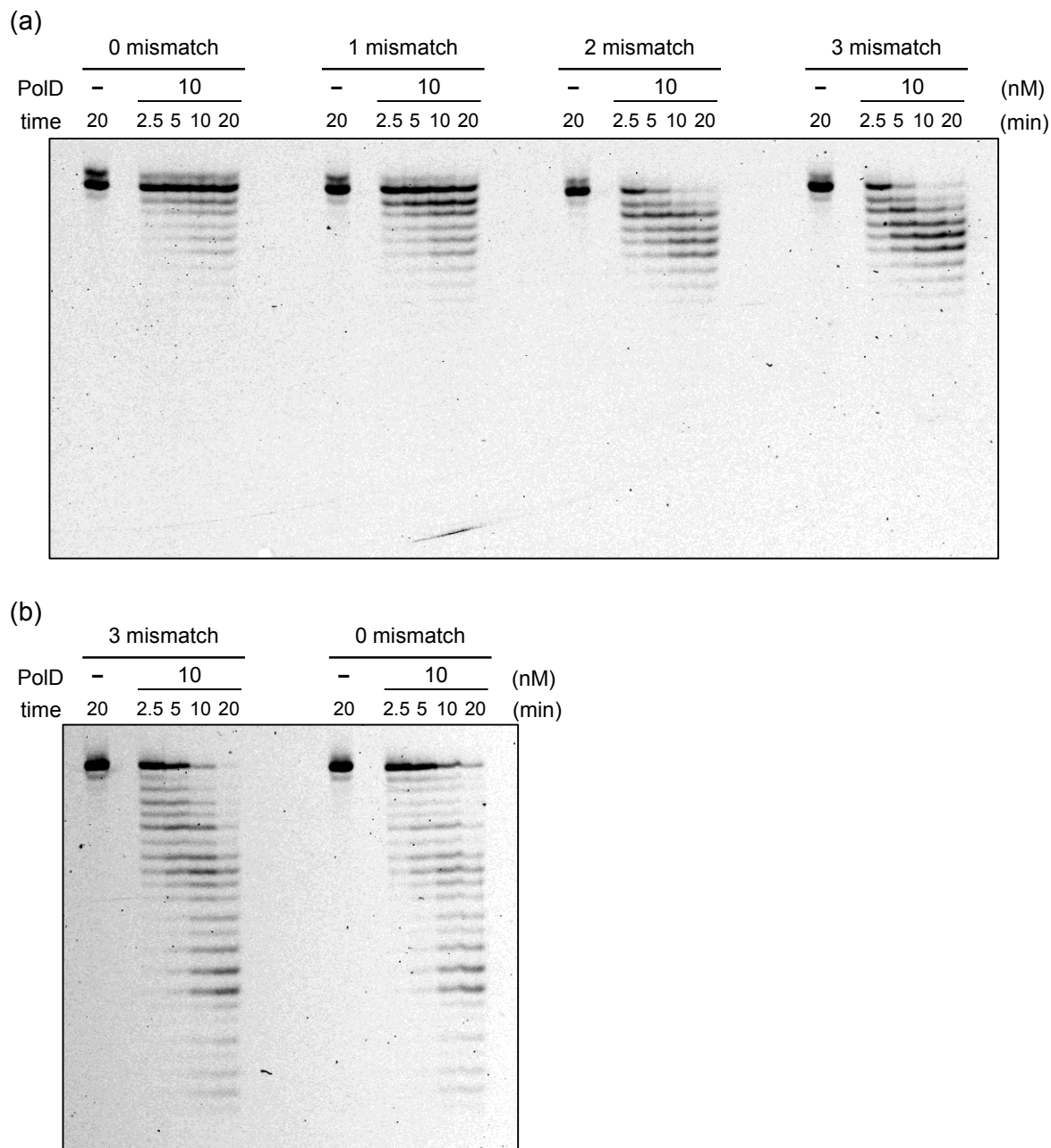


図 2-8 3'末端側にミスマッチ塩基対を含むDNAに対する3'-5'エキソヌクレアーゼ活性

(a) 細胞内二価金属イオン濃度におけるミスマッチ塩基対を含むDNAに対するTkoPolDの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を検出した結果。図の上部に用いた基質DNAに含まれるミスマッチ塩基対の数を示している。PolDまたはtimeの行の数字は、それぞれ添加したタンパク質の濃度および反応時間を示している。(b) 2 mMのマグネシウムイオン濃度におけるミスマッチ塩基対を含むDNAに対するTkoPolDの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を検出した結果。図の上部に用いた基質DNAに含まれるミスマッチ塩基対の数を示している。PolDまたはtimeの数字はそれぞれ添加したタンパク質の濃度および反応時間を示している。反応産物は8 Mの尿素を含む変性ゲル電気泳動で分析した。

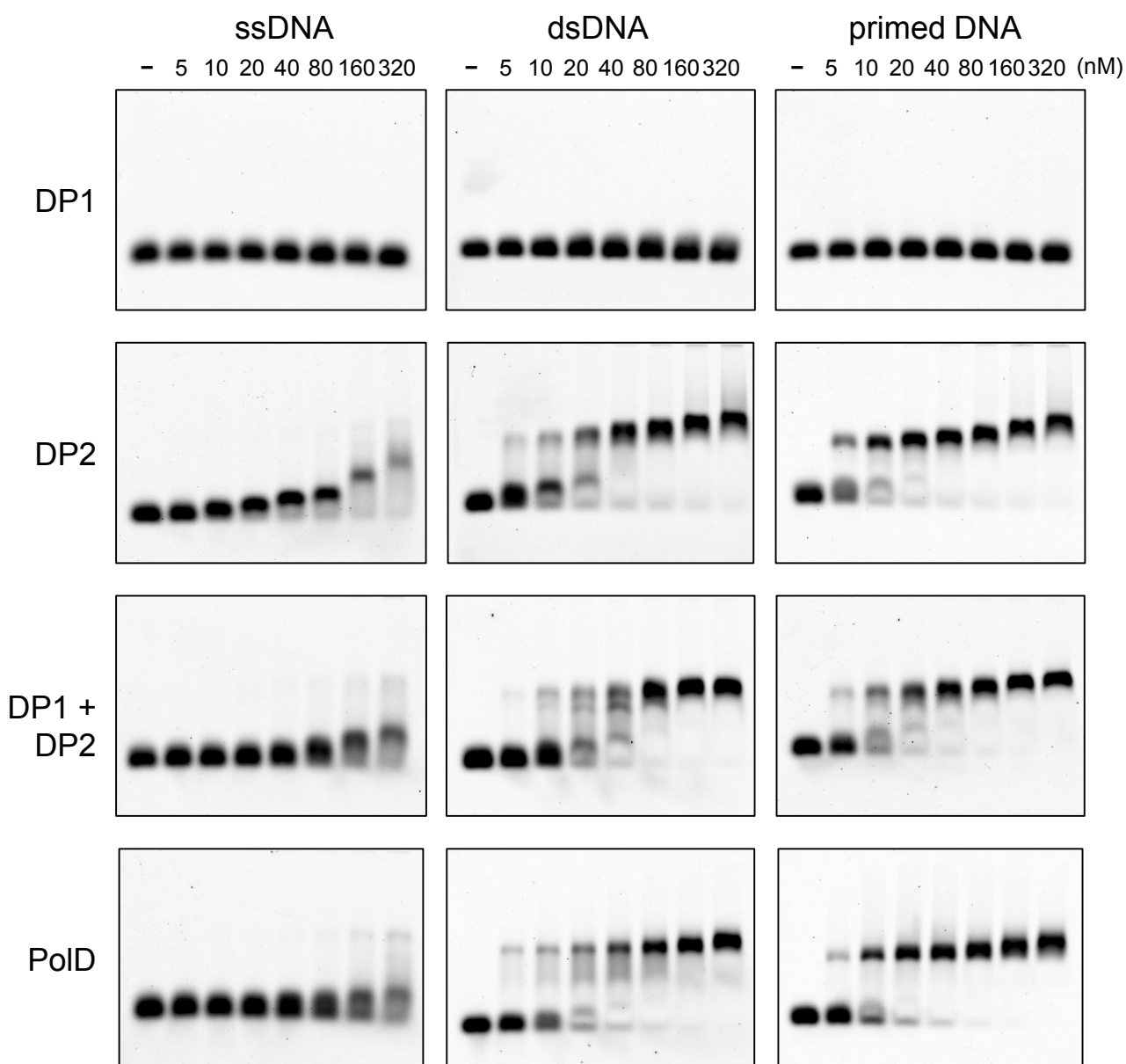


図 2-9 DNA結合活性

TkoDP1、TkoDP2、再構成TkoDP1+DP2、TkoPolDのDNA結合活性をゲルシフトアッセイによって検出した結果。基質にはssDNA (左側)、dsDNA (中央)、primed DNA (右側) を用いた。各タンパク質の濃度は図の上部に示した。各パネルの左側には用いたタンパク質の種類を示した。

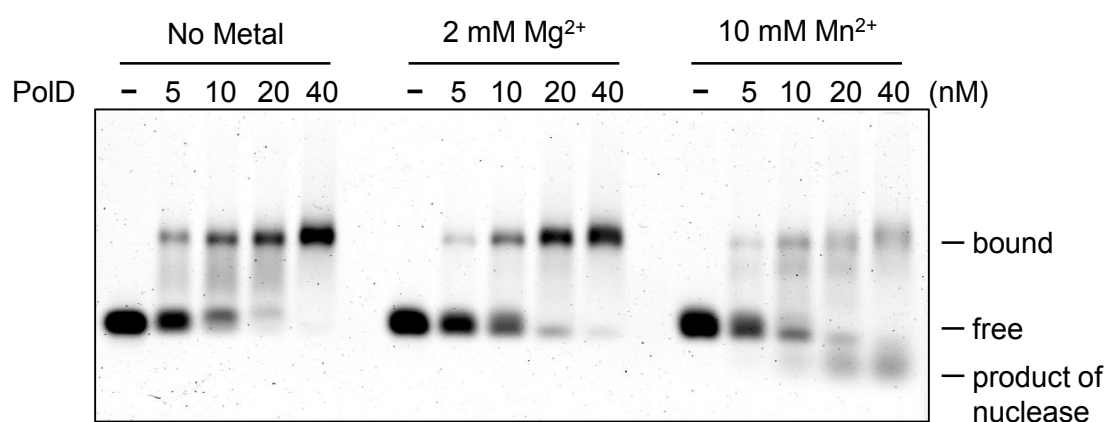
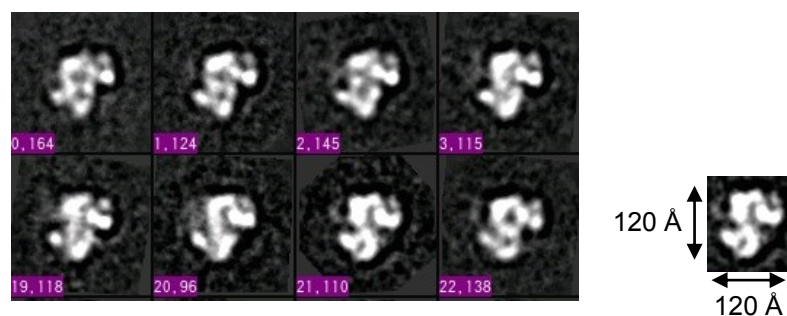


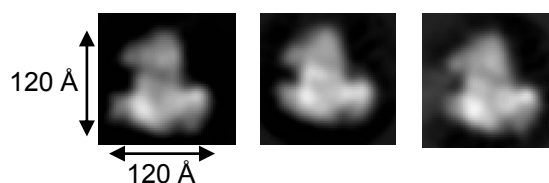
図 2-10 DNA結合活性の二価金属イオン依存性

TkoPolDのDNA結合活性をマグネシウムイオンまたはマンガンイオン添加条件においてゲルシフトアッセイによって検出した結果。図の最上部に、二価金属イオンがない条件 (左側)、マグネシウムイオンを添加した条件 (中央)、マンガンイオンを添加した条件 (右側) を示し、用いたタンパク質の濃度は図の上部に示した。図の右側にシフトバンドの位置とその時に予想されるDNAまたはDNA-タンパク質複合体の状態について示した。

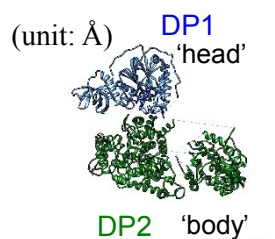
(a)



(b)



(c)



(d)



図 2-11 電子顕微鏡による単粒子解析

(a) 負染色法によって観察されたTkoPolDのクラス平均像。17,140個の粒子を200のクラスに分類した代表的な8種類を示した。右の図は、下段右から二つ目の粒子の大きさを示している。(b) クライオ電子顕微鏡法によって観察されたTkoPolDのクラス平均像。クラスの平均化にはそれぞれ1,007個 (左)、829個 (中央)、908個 (右) の単粒子像を用いた。平均像の大きさは矢印で示している。(c) 平均像を基に作成したTkoPolDの推定原子モデル。結晶構造にはPabDP1(PDB ID: 5IHE) とPabDP2 (PDB ID: 5IJL) を用いた。(d) (b)で示したTkoPolD推定原子モデルの投影像。投影像の解像度は電子顕微鏡の解像度と同程度まで低下させた。

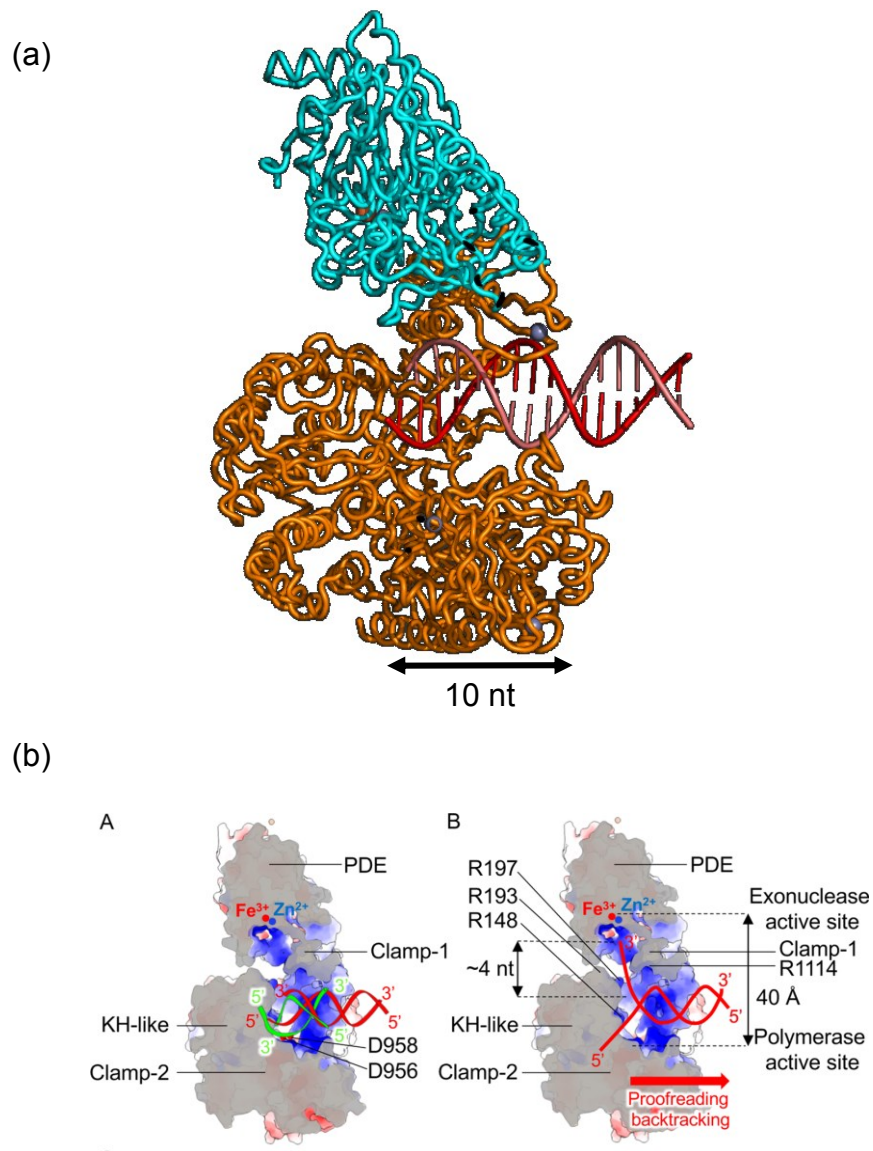


図 2-12 PabPolD-DNA複合体の構造

(a) 各サブユニットおよびDNA鎖は色を分けて表している。シアン: PabDP1、オレンジ: PabDP2、ピンク: プライマー鎖、赤: 鋳型鎖。図の下部の矢印と数字はプライマー鎖の3'末端からのヌクレオチド数を表している。EMDB ID: EMD-0244。(b) PabPolDのA: ポリメラーゼモードとB: エキソヌクレアーゼモードの構造。Raiaらの論文より引用 (Raia et al., 2019)。

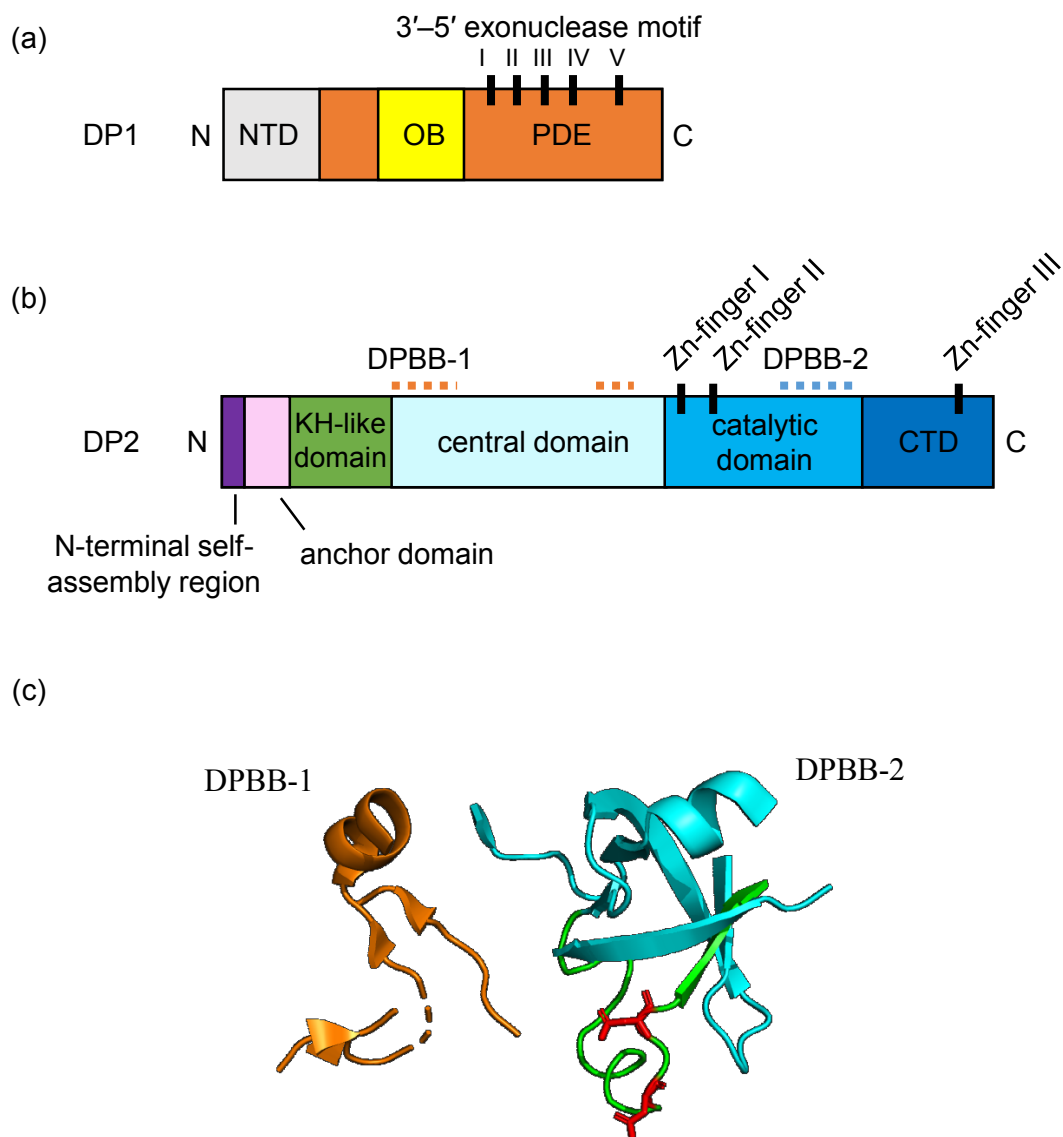


図 2-13 *P. abyssi*の構造から得られた各サブユニットのドメイン構成とポリメラーゼ活性部位
 (a)小サブユニットのドメイン構成の模式図。それぞれ、灰色: N-terminal domain、オレンジ: PDE domain、黄: OB domain、黒線: 3'-5'エキソヌクレアーゼモチーフを表している。(b) 大サブユニットのドメイン構成の模式図。それぞれ、紫: N-terminal self-assembly region、ピンク: anchor domain、緑: KH (K homology)-like domain、シアン: central domain、青: catalytic domain、ダークブルー: C-terminal domain、オレンジ破線: DPBB-1、水色破線: DPBB-2、黒線: Zn-finger I、II、IIIを表している。(c) PabDP2(1-1050)の結晶構造のうち、DPBBモチーフと触媒活性に関わる構造。オレンジ: DPBB-1 (DPBB-B)、シアン: DPBB-2 (DPBB-A)、緑: 触媒ループ、赤: 触媒残基。PDB ID:5HIJ。本図はSauguetらおよびRaiaらの報告をもとに作成した (Raia et al., 2019; Sauguet et al., 2016)。

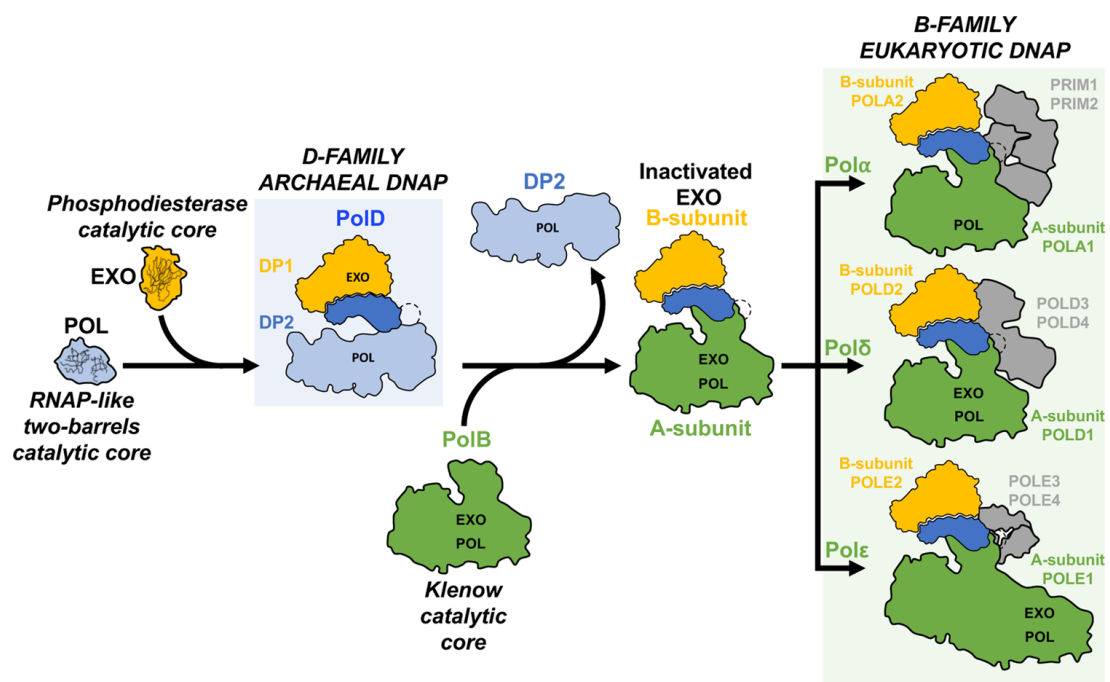


図 2-14 アーキアファミリーD DNAポリメラーゼの起源と真核生物複製DNAポリメラーゼとの進化的関係を説明する仮説
Raiaらの論文から引用 (Raia et al., 2019)。