

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：



氏 名 : 高 島 夏 希

論文題名 : 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～

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 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 の調製方法を確立し、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。