

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 名	超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> 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～			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	石野 良純
	副 査	九州大学	教授	角田 佳充
	副 査	九州大学	准教授	石野 園子
	副 査	九州大学	准教授	西本 悦子

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、アーキアにおけるゲノム DNA 維持機構の中で中心となる DNA 鎖合成を担う DNA ポリメラーゼについて、その性質を解析したものである。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 の DNA ポリメラーゼ (PolD) はアーキア特有の酵素であり、クレンアーキオタ門以外のアーキアでホモログ遺伝子が存在することが多くのゲノム解析の結果から分かってきた。ファミリーB の DNA ポリメラーゼ (PolB) と PolD を一つずつ持つユリアーキオタ門において、PolB と PolD が、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が、PolB をコードする遺伝子を破壊しても生育に影響ないという報告が出て、PolD がより一層注目されるようになった。

まず、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の PolD を構成するタンパク質である TkoDP1、TkoDP2 および両者の複合体である TkoPolD の高純度調製法を詳細に検討した。TkoDP1 は大腸菌を宿主とすると分解されやすく、高純度精製が困難であったが、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できることを発見した。また、TkoDP2 および TkoPolD の精製では、分離が困難であった不純物を、陰イオン交換カラムに ENrich™ Q カラムを用いることによって除去できた。また、大腸菌を宿主として、TkoDP1 と TkoDP2 を共産生させることによる TkoPolD の高純度調製法も確立した。

得られた精製タンパク質を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行ったところ、TkoDP1 が分子量を反映した挙動を示さなかったもので、静的光散乱解析法を導入して解析した結果、TkoDP1 が溶液中で単量体で存在することを突き止めた。さらに TkoDP1 分子の大きさを推定し難いのは 170 アミノ酸からなる天然変性領域が含まれることに起因することを示した。両サブユニットの共産生系で調製した TkoDP2 についても同様に、静的光散乱解析を組み合わせたゲルろ過により、それぞれが一分子ずつから成るヘテロ二量体を形成することを示した。また、試験管内で TkoDP1 と TkoDP2 を混合することによって、それぞれが一分子ずつから成るヘテロ二量体が効率良く再構成されることも示した。さらに、電子顕微鏡による単粒子解析によって、TkoPolD が、サブユニット構成比が 1:1 から成るヘテロ二量体であることを支持する結果を示すとともに、TkoPolD 分子が単一ペプチドから成る他の DNA ポリメラーゼのような球形ではなく、扁平な構造をとっていることを示した。

次に、それぞれのサブユニットの役割を解明するために、各精製タンパク質を用いて機能解析し、TkoDP1 および TkoDP2 がそれぞれ 3'→5' DNA 分解活性、5'→3' DNA 合成活性にとって重要な役割を担うが、それぞれ単独では活性を示さないものの、複合体を形成することによって初めて顕著な活性が現れることを示した。また、TkoDP1 は DNA に対する親和性が極めて低く、TkoDP2 が強い DNA 結合活性を有することを発見し、TkoPolD の DNA 結合は TkoDP2 が担うことを示した。

以上要するに、本論文はアーキア特有の DNA 複製酵素 PolD の DP1, DP2 サブユニット構成比を確定すると共に、それぞれのサブユニットの機能を明らかにしたもので、ファミリーD の DNA ポリメラーゼの構造と機能の理解に大きく貢献したことから、分子生物学および極限環境生物学の進歩に寄与する価値ある業績と認める。

よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。