

Studies on the regulation of DNA replication fork progression in *Thermococcus kodakarensis*

永田, 麻梨子

<https://hdl.handle.net/2324/2236310>

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：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名	永田 麻梨子			
論 文 名	Studies on the regulation of DNA replication fork progression in <i>Thermococcus kodakarensis</i> (<i>Thermococcus kodakarensis</i> におけるDNA複製フォークの進行制御に関する研究)			
論文調査委員	主 査	九州大学	教授	石野 良純
	副 査	九州大学	教授	釣本 敏樹
	副 査	九州大学	教授	片山 勉
	副 査	九州大学	准教授	石野 園子

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、特に DNA 複製の進行機構を解明するために、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* が有するタンパク質因子について生化学的および遺伝学的手法により詳細な分子機構解析を行って得られた作用機序の理解をまとめたものである。

複製過程で作用するヘリカーゼとして、真核生物とアーキアでは MCM(minichromosome maintenance)がその活性の中心を担い、GINS(go-ichi-ni-san)がその補助をすることがわかっていた。著者は、生物の3ドメインに広く保存される Cdc45/RecJ ファミリータンパク質に着目し、超好熱 *T. kodakarensis* が有する二種のタンパク質 GAN (GINS-associated nuclease)と HAN (Hef-associated nuclease) について詳細に解析した。まず、GAN が GINS を介して、GAN-GINS-MCM 三者複合体を形成することを示し、真核生物の複製ヘリカーゼ複合体とは違った様式で機能することを明らかにした。さらに、*T. kodakarensis* において *gan* 遺伝子欠失株を単離し、GAN の欠損が対数増殖期における生育遅延と、至適生育温度 (85°C) よりも高温 (93°C) では生育できないという高温感受性をもたらすことを発見した。このことから、GAN が *T. kodakarensis* の DNA 複製にとって必須ではないものの、細胞増殖速度に影響を与え、特に高温環境においては GAN が生育必須因子として機能すると結論づけた。また、バクテリアにおける *recJ* 遺伝子欠失株と異なり、*T. kodakarensis* の *gan* 遺伝子欠失株は紫外線耐性に影響がないことから、GAN にはバクテリアの RecJ のような修復機能が無いことを示した。さらに、GAN は *in vitro* において一本鎖 DNA 特異的な 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示すものの、このヌクレアーゼ活性は *T. kodakarensis* 細胞内においては必要なく、実際に機能していないことを示す実験結果をもとに、ヌクレアーゼとしての GAN の機能を否定した。

次に、HAN は一本鎖 DNA および RNA に対する 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有することを示した。その DNase 活性と、DNA 複製進行停止の修復因子である Hef(helicase-associated endonuclease for fork-structured DNA) が有するフォーク構造 DNA の分岐点特異的エンドヌクレアーゼ活性が相互に制御されることを発見して、Hef と HAN による協調的な進行停止フォークの修復機構モデルを提唱した。また、*hef* 遺伝子欠失株が紫外線、マイトマイシン C、高温に対する顕著な感受性を示すのに対し、*han* 欠失による細胞生育への影響は大きくないものの、*gan* と *han* の二重欠失株は *gan* 欠失株よりもさらに強い温度感受性を示すことを示した。これらの結果から、GAN を含まない不完全なヘリカーゼ複合体によるフォーク進行は障害を受け易く、進行停止の修復がより重要になるこ

と、そして、Hef の補助機能を担う HAN の働きが欠失することで、高温での複製フォーク進行停止による生育障害がより顕著になることを提唱した。

さらに、一本鎖結合タンパク質である Replication protein A (RPA) の DNA ポリメラーゼに対する影響を調べ、*T. kodakarensis* の RPA が *in vitro* において、複製を担う DNA ポリメラーゼである PolD と直接相互作用して PolD による DNA 合成反応を促進することを示した。その結果から、RPA がレプリソームの一員として新生鎖合成効率を上昇させることを提唱した。また、PolD が GINS と相互作用し、PolD の結合した GINS がさらに MCM の二本鎖解離活性を促進することを見出した。この結果から、DNA 複製時にヘリカーゼとポリメラーゼが連動して働くことで、二本鎖解離と新生鎖合成の進行速度を都合よく調節するという分子機構を提唱した。

以上要するに、本論文は、生命の維持にとって必須の DNA 複製機構の中で、複製フォークの適切な進行を担うタンパク質因子についての多くの重要な知見を得て、その分子機構の理解を大きく前進させたもので、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。