

Studies on the replisome formation in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*: biochemical and structural anatomy

沖, 啓輔

<https://hdl.handle.net/2324/4784695>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名 : 沖 啓輔

論文題名 : Studies on the replisome formation in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*: biochemical and structural anatomy
(超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における DNA 複製複合体の機能及び構造解析)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生物のゲノム DNA 維持機構のなかでも、アーキアにおける DNA 複製タンパク質の高次複合体 (レプリソーム) に注目し、生化学的および構造生物学的手法によって得られた詳細な分子機構解析の理解をまとめたものである。これまでの研究で、DNA 複製に関与する主要な因子として、DNA ポリメラーゼの他、二本鎖 DNA を開裂するヘリカーゼや、RNA プライマーを合成するプライマーゼについてそれぞれ解析が成されてきたが、これらが協調して働くための、機能的な超分子複合体形成の分子機構に関してはほとんど理解されていなかった。著者は、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるレプリソーム形成の分子機構を明らかにすべく、ゲノムにコードされる DNA 複製関連タンパク質を、リコンビナントタンパク質として精製し、形成される複合体の機能と構造の関係を解析した。

第一章において、地球上の生物を分類する三つのドメイン (細菌、アーキア、真核生物) のうち、アーキアに関する歴史を要約した。その中で本研究に用いた超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の特徴を記述したのち、各ドメインにおける DNA 複製機構を概説した。アーキアは細菌と同様に核を持たない原核生物であり、ゲノムは環状の二本鎖 DNA により構成される一方で、DNA 複製に関わるタンパク質因子の多くは、真核生物のものと類似している。*T. kodakarensis* におけるレプリソームの詳細な分子機構を解明することは、アーキアにおける DNA 維持機構の理解にとどまらず、生命の進化の過程を理解する上でも有用であるという、本研究の意義について記述した。

第二章では、アーキア特有の DNA 合成酵素である DNA ポリメラーゼ D (PolD) が、連続的 DNA 鎖伸長に必須な補助因子である PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) とともに DNA を伸長する際の立体構造を解明した結果について記述した。PolD は二つのサブユニット (DP1、DP2) からなるヘテロ二量体であり、これらをコードする遺伝子は Crenarchaeota phylum を除く大部分のアーキアで高度に保存されている。*T. kodakarensis* を含む数種のアーキアでは生存に唯一必須な DNA ポリメラーゼであると報告されているが、その全体構造は未解明であった。著者は PolD の生化学的解析を行い、触媒サブユニット DP2 の C 末端ドメインが DP1 サブユニットとの結合に重要であることを明らかにした。続いて、PolD と PCNA および基質となる DNA とで三者複合体を形成させたのち、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行って二種類の立体構造解明に成功した。それらは DNA 合成モードと間違った合成を修正する校正モードであることを強く示唆するものであった。また、明らかになった複合体構造中の DP1-DP2 サブユニット間の相互作用様式が、真核生物の染色体合成に関わるファミリー B DNA ポリメラーゼにも保存されていることを発見した。さらに、PolD-PCNA 間では、広く知られている PIP (PCNA Interacting Protein) -box を介した相互作用に加えて、新規相互作用部位を発見し、この相互作用が PolD がそれぞれ合成モードと校正モードとして安定に働く機能を果たすと仮定した。部位特異的変異体作成によってこの仮説を裏付けることによ

り、発見した PolD-PCNA 間の相互作用が、PolD の合成機能と校正機能を切り替える”switch hook”機構として働くことを提唱した。

第三章は、二本鎖 DNA を開裂するヘリカーゼ複合体である CMG ヘリカーゼと PolD の複合体形成に関する解析結果について記載した。MCM (Minichromosome maintenance)と GINS、および GAN (GINS-associated nuclease) で構成される CMG ヘリカーゼ複合体と PolD が協調して働くための相互作用が存在すると予想して研究を進めた。まず、ヘリカーゼ複合体中の GINS が 2 分子の PolD と結合することを証明し、それぞれの PolD がリーディング鎖合成、ラギング鎖合成を担当する対称的なレプリソームを形成すると考えた。次にこの相互作用は、PolD の DP1 サブユニットの N 末端ドメイン(DP1N)と GINS の Gins51 サブユニットの C 末端ドメイン(Gins51C)との結合によることを示し、DP1N/Gins51C/GAN 三者複合体を単離して結晶構造解析を行なった。得られた結晶構造から、すでに報告されていた真核生物の CMG ヘリカーゼ/Polε 複合体と相互作用部位の立体構造の保存性を発見した。これは、アーキア-真核生物間での複製装置の進化的な繋がりを裏付ける証拠として重要である。さらに、リーディング鎖合成の再構成系を構築して機能を調べた結果、DP1N-Gins51C を介した結合が存在する条件でのみ、PolD が CMG 様ヘリカーゼの一本鎖 DNA 依存性の ATP 分解能を上昇させ、ヘリカーゼ活性を促進した。すなわち、レプリソームの最先端に位置するヘリカーゼにポリメラーゼが結合することによって、鋳型になる親 DNA 二本鎖を解く反応が促進されるという機能的な相互作用を初めて実験的に証明した。

第四章は、RNA プライマーを合成するプライマーゼ (PriL/PriS 複合体) を含めた複合体形成に関する解析の結果を記載した。真核生物では、連続的な伸長をおこなう Polδ、Polε に加えて、Polα がプライマーゼと複合体を形成することでプライマー合成を行う。著者は *T. kodakarensis* において、PolD がプライマー合成と DNA 新生鎖合成の両方に関与すると予想して研究を進めた。生化学的解析により、CMG ヘリカーゼ複合体とプライマーゼに直接の相互作用はないが、PolD が両者のブリッジとなって複合体を形成することを発見した。PolD/プライマーゼ複合体に関して詳細な解析を進めたところ、PolD の DP2 サブユニットの C 末端に存在する疎水性残基が PriL との結合に重要であった。結晶構造解析により PriL の N 末端ドメインに存在する疎水性ポケットに、ヘリックス構造を形成した DP2 の C 末端が結合することを明らかにした。同様に DP2 の C 末端領域へ結合する PCNA との競合実験を行ったところ、DNA の非存在下では PolD/プライマーゼ複合体が形成されるが、DNA が加わるとプライマーゼは解離し PolD/PCNA/DNA 複合体が形成されることを発見した。この結果は、PolD がプライマーゼと複合体を形成する複製開始モードから、PCNA と複合体を形成する伸長モード (連続的合成) へ、レプリソームを機能的に変換する分子機構を示していると提唱した。

以上の解析結果を基に、*T. kodakarensis* におけるレプリソーム形成と、その構造変換による機能発現の分子機構についての研究成果を第五章において要約し、結論として述べた。