九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

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)

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名	沖　啓輔
論　文　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)
論文調査委員	主　査　九州大学　教授　氏名　石野 良純 副　査　九州大学　教授　氏名　角田 佳充 副　査　九州大学大学院薬学研究院　教授　氏名　片山　勉 副　査　九州大学　准教授　氏名　石野 園子 副　査　九州大学　准教授　氏名　沼田 倫征

論　文　審　査　の　結　果　の　要　旨

本論文は、アーキアにおける DNA 複製進行の分子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構造生物学的手法により詳細な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主要な因子として、DNA ポリメラーゼ、ヘリカーゼ、プライマーゼについて、それぞれ個々に解析されてきたが、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。*T. kodakarensis* において、ヘリカーゼとしての活性中心を担う MCM (minichromosome maintenance) が、GINS (go-ichi-ni-san)と GAN (GINS-associated nuclease)とで複合体（CMG ヘリカーゼ）を形成して機能する。PriL と PriS から成るプライマーゼが RNA プライマーを合成し、DP1 と DP2 から成る DNA ポリメラーゼ D（PolD）が DNA 新生鎖を合成するレプリカーゼとして機能する。著者は、*T. kodakarensis* 由来のこれら 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。

まず PolD と、連続的 DNA 鎖伸長に必須な補助因子である Proliferating Cell Nuclear Antigen（PCNA）および基質 DNA とで三者複合体を形成させ、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行って、初めて PolD 全分子の立体構造を明らかにした。そして DNA 合成モードと、間違った合成を修正する校正モードを強く示唆する二種類の複合体構造解明に成功した。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 の合成機能と校正機能を切り替える”switch hook”として機能することを提唱した。

次に、CMG 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。そして、CMG と PolD の相互作用が、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突止め、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 ヘリカーゼと Pol ε との相互作用様式の類似性を発見し、アーキア/真核生物型レプリソームにおいて、ヘリカーゼとレプリカーゼの相互作用の重要性を示した。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 ヘリカーゼ活性を促進することを発見した。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。

著者はさらに、プライマーゼを含めた複合体形成の解析を行い、PriL の N 末端ドメインに存在する疎水性ポケットに、DP2 の C 末端ヘリックス構造が結合することを結晶構造解析により明らかにした。真核生物では、Pol α とプライマーゼが安定な複合体として存在し、合成されたプライマーゼによって合成された RNA プライマーに Pol α が 短鎖 DNA を付加した後、Pol δ へ引き継がれることが提唱されているが、アーキアでは PolD が Pol α と Pol δ の両方の役割を果し、プライマー合成と DNA 新生鎖合成の両方に関与していると推定した。さらに、DP2 の C 末端領域へ結合する PCNA との競合実験を行い、DNA の非存在下では PolD/プライマーゼ複合体が優先的に形成されるが、DNA が加わるとプライマーゼが解離し PolD/PCNA/DNA 複合体が形成されることを発見して 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提唱した。

以上要するに、本論文は、DNA 複製フォークの適切な進行を担うタンパク質因子間の相互作用について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あり、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。