

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

論文題名：Studies on the regulation of DNA replication fork progression in *Thermococcus kodakarensis*
(*Thermococcus kodakarensis*におけるDNA複製フォークの進行制御に関する研究)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、アーキアにおけるゲノム DNA 維持機構の中でも、DNA 複製の進行機構に着目し、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。

第一章の序論において、生物のゲノム安定性維持機構を概説し、本研究で用いた超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の特徴および、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の性質等についてまとめている。

第二章では、*T. kodakarensis* における Cdc45/RecJ ファミリーのひとつである GAN (GINS-associated nuclease)の生化学的および遺伝学的性質、そして DNA 複製因子 MCM および GINS との相互作用に関する解析結果について記載されている。著者は、*T. kodakarensis* における MCM が GINS を介して、GAN-MCM-GINS 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である CMG 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、真核生物における *cdc45* 遺伝子が生存に必須であるのに対して、*T. kodakarensis* において *gan* 遺伝子欠失株を単離し、*gan* 欠失株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示すことを発見した。また、バクテリアにおける *recj* 遺伝子欠失株と異なり、*gan* 遺伝子欠失株は紫外線感受性を示さなかった。以上の結果から、*T. kodakarensis* の GAN にはバクテリアの RecJ のような修復機能は無く、また、DNA 複製は GAN が存在しなくても進行するが、GAN がないと細胞増殖速度が低下し、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。

第三章では、ユリアーキアに属するアーキア特有の Cdc45/RecJ ホモログである HAN (Hef-associated nuclease)の生化学的および遺伝学的性質、そして DNA 複製進行停止の修復因子である Hef との相互作用に関する解析結果について記載されている。著者は、HAN の一本鎖 DNA および RNA に対する 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を同定し、その活性と Hef 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た。また、*hef* 遺伝子欠失株が UV、MMC、高温に対する顕著な感受性を示すのに対し、*han* 欠失による影響は大きくないこと、しかし *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発見した。以上の実験結果を基に、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。この結果に基づき、複製フォーク進行停止時における Hef と HAN による協調的な修復機構モデルを示した。

第四章では Replication protein A (RPA) の DNA ポリメラーゼに対する影響を調べた結果について記載されている。RPA は ssDNA 結合タンパク質であり、DNA 複製をはじめ様々な DNA 代謝機

構に関与している。著者は、*T. kodakarensis* の RPA が *in vitro* において PolB および PolD と直接相互作用することを見出した。さらに、PolB による DNA 合成反応は RPA 存在化でも DNA 鎖は伸長されており、ssDNA に結合した RPA を押しのけて DNA 合成が進行したことが示唆されるものの、RPA の非存在化に比べて阻害された一方で、PolD による DNA 合成反応は RPA による補助的作用を受けて促進されることを示した。この結果を基に、RPA が鋳型 ssDNA の二次構造を解消することで DNA 鎖合成反応を促進し、レプリソームの一員として複製を担う DNA ポリメラーゼと直接相互作用することによって新生鎖合成効率を上昇させることを提唱した。

第五章では、*T. kodakarensis* におけるヘリカーゼの二本鎖解離進行機構の解析結果について記載されている。著者は、アーキア独自の DNA 複製ポリメラーゼである 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。

以上の研究成果を要約し、第六章において結論として述べている。