

論文要旨

好熱性古細菌由来ゲノム安定性に働く PCNA とウラシル DNA グリコシラーゼの構造生物学的研究

河合 聡人

DNA 複製・修復・組換え (3R) などゲノムの安定性に関わる生命活動では多くのタンパク質が協調的に働くことが知られている。そして、個々のタンパク質が 3R の場面に応じた役割を正確に行うことが 3R の円滑な進行の鍵になると考えられる。筆者らは 3R の場面を再現した構造解析を行うことで個々のタンパク質の役割を明確にすることを目標に、3R の機構が真核生物と類似していると考えられている好熱性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* をモデル生物にした構造生物学的研究に着手した。本研究では、*stoPCNA* とウラシル DNA グリコシラーゼ (*stoUDG*) の働く仕組みについて、主に X 線結晶構造解析法を用いて解明したので、以下にその概要を記す。

stoPCNA2-stoPCNA3 複合体の構造生物学的研究

PCNA は真核生物・古細菌が有する DNA クランプの 1 種で、DNA ポリメラーゼと直接相互作用することでそのプロセッシビティを向上させ、さらに、3R に関わる多くのタンパク質と相互作用することでそれらの足場としての役割を担うタンパク質である。*stoPCNA* では機能性複合体としてヘテロ三量体 (*stoPCNA123*) を形成することが知られていた。これに加えて、このヘテロ三量体から *stoPCNA1* が存在しない状態、つまり、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体の状態でも *stoPCNA123* と同程度の大きさの複合体を形成することが発見された。この *stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体は *stoPCNA123* のように 3R 関連タンパク質の働きを助長することも分かった。このことから、*stoPCNA* では機能性複合体を構成する分子の種類と数を変化させることで DNA クランプの多様性を生み出しているのではないかと示唆された。そこで、この DNA クランプの違いを立体構造から議論するため、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体の X 線結晶構造解析を実施した。その結果、本複合体は *stoPCNA2* が 2 分子、*stoPCNA3* が 2 分子で、互いに head-to-tail の相互作用によって形成されたヘテロ四量体で存在し、その外形が楕円状であることを明らかにした (Fig. 1)。さらに、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーと X 線溶液散乱を用いた実験を行い、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体は溶液中でも結晶構造同様にヘテロ四量体の楕円状構造を形成していることを証明した。また、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体の結晶は空間群の異なる

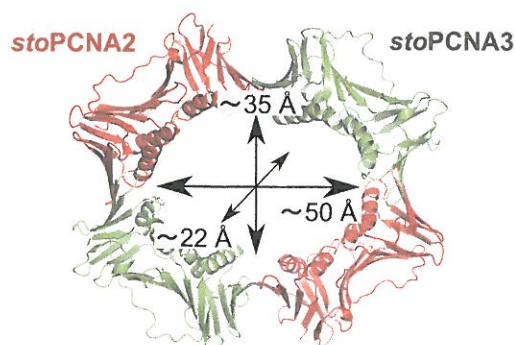


Fig. 1 Overall structure of the *stoPCNA2-stoPCNA3* complex.

る2種類を得ることに成功したため、ヘテロ四量体としては3種の立体構造を決定できた。これらの立体構造をもとに、複体内に4ヶ所存在する分子間の相互作用面は比較的硬い面と柔軟な面の2種類が存在することを発見した。この2種類の異なる相互作用面が存在することで、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体は硬い相互作用面を介して強固なヘテロ二量体を形成し、このヘテロ二量体2つが柔軟な相互作用面を介して蝶番状に動くという分子の動きに関する知見を得た。今回明らかになった立体構造上の特徴と過去の報告を踏まえ、*stoPCNA2-stoPCNA3* 複合体の新生DNA鎖保護と Holliday junction クランプという2つの機能の可能性を提案した。

stoUDG の構造生物学的研究

DNA中のウラシルは、自然発生や酵素的に起こるシトシンの脱アミノ化反応により生成される。このように生成されたウラシルが存在したままDNA複製が開始されるとG:C→A:Tの変異につながってしまうため、通常、ウラシルは事前に塩基除去修復機構によって修復される。この際、ウラシルを認識・切断する酵素がUDGである。UDGは様々な生物（ウイルスを含む）にその存在が確認されており、立体構造の解明も盛んに行われてきたが、古細菌由来UDGの立体構造は未だ解明されていなかった。そこで、*stoUDG*の立体構造を解明し、他の生物由来UDGと比較することでUDGの普遍性と特異性を明確にしたいと考え、*stoUDG*のX線結晶構造解析に着手した。しかしながら、野生型*stoUDG*の結晶を再現性よく得ることが出来なかった。そこで、Disorder予測ならびに二次構造予測の結果を参考にして、*stoUDG*のC末欠失変異体(*stoUDG* Δ)を作成した。*stoUDG* Δ については再現性よく得られる結晶化条件を見出し、アポ体およびウラシル複合体の構造をともに1.7Å分解能で決定することに成功した(Fig. 2a)。これらの構造から*stoUDG* Δ は他のUDG同様に $\alpha/\beta/\alpha$ 三層サンドイッチ構造を形成していて、ウラシルの認識はほとんどの生物で高度に保存されていることが明らかになった(Fig. 2b)。次に、DNA複合体モデルを構築し、その構造からウラシルが存在するヌクレオチド部分がflipped-outした際に生じる空間を埋めるアミノ酸残基を絞り込み、最終的には変異体実験を実施することでTyr170がこの役目を担うことを明らかにした。これは他のファミリー4UDGでは観察されなかったDNA複合体形成時の構造変化を示唆する知見であった。さらにこの特徴は、2次構造予測に基づくアミノ酸配列のアライメントから他の好熱性古細菌由来UDGにも当てはまるような傾向であったため、このDNA結合時の構造変化が好熱性古細菌由来UDG共通の特徴であると推定した。

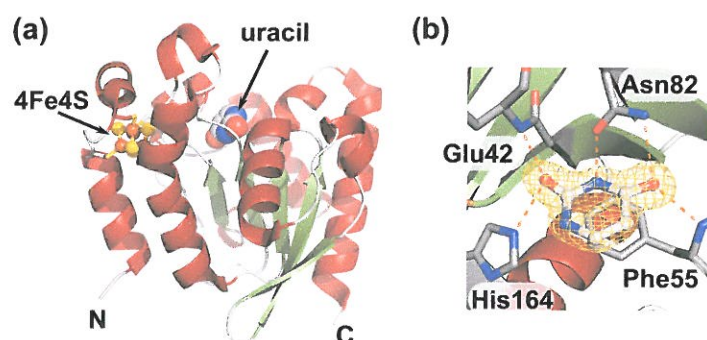


Fig. 2 Crystal structure of *stoUDG*.
(a) Overall structure. (b) Close-up view of the uracil binding pocket.