

論文の内容の要旨

論文題目 真核型 DNA プライマーゼの構造生物学的研究

氏 名 伊藤 晋敏

DNA は遺伝情報を担う分子であり、細胞分裂の際その情報は正確に維持されなければならない。すなわちあらゆる生物にとって DNA 複製は、遺伝情報の子孫への伝達という観点から最も重要な現象である。したがって DNA 複製機構の解明は、発生、分化、癌化、老化など多くの生命現象を理解する上で必要不可欠である。

新生 DNA 鎖の合成は、DNA ポリメラーゼが鋳型 DNA 上にプライマー分子が存在することで初めて DNA 合成を行うことができる。原核及び真核細胞の染色体 DNA 複製では新生 RNA 鎖からなるプライマーを利用している。この新生 RNA 鎖は DNA プライマーゼが 1 本鎖 DNA を鋳型、2つのヌクレオチド 5'-3' リン酸(NTP)を基質として最初のジヌクレオチドから合成を開始するが、その長さはおよそ7から10塩基程度である。

近年の研究の進展により DNA/RNA ポリメラーゼや DNA プライマーゼの立体構造については、非常に数多くの知見が得られている。とりわけ DNA ポリメラーゼに関しては、プライマー/鋳型 DNA 及び基質との複合体の構造解析などから触媒反応機構の理解が進んでいる。しかしそれに対してプライマーゼは、原核型 (ref 1,2) 及び真核型 (ref 3) の酵素単体の立体構造が報告されているのみである。従って、ポリメラーゼがプライマーの存在無しに DNA 合成を行えないのに対し、なぜプライマーゼが最初の2つのヌクレオチドからプライマー-RNA の合成を開始できるのかという問題は未だ残されたままである。そこで本研究の目的は、プライマーゼによるプライマー-RNA の合成開始機構を原子レベルで明ら

かにすることである。

本研究を行うにあたり、耐熱性に優れ結晶化に有利であることから超好熱性古細菌 *P. horikoshii* 由来の真核型 DNA プライマーゼホモログを用い立体構造解析を行った。

まず *P. horikoshii* DNA プライマーゼ組換えタンパク質を大腸菌内で発現させるために遺伝子のクローニング及び発現系の構築を行った。組換えタンパク質は2段階のカラムクロマトグラフィーで高度に精製し、活性測定を行った後に結晶化を行った。結晶は PEG8000 を沈殿剤として得られ、その空間群は $P3_221$ に属し、結晶格子はおよそ $a=b=79\text{Å}$ 、 $c=129\text{Å}$ であった(ref. 4)。立体構造決定は、セレノメチオニン(SeMet)置換体結晶を用い、多波長異常分散(MAD)法により行った。MAD データ収集は、シンクロトロン放射光施設 SPring-8BL41XU において X 線蛍光スペクトルを測定し、セレンの吸収端の波長を決定した後に 4 波長での回折データを収集した。この回折データを用い位相計算を行った結果、解釈可能な電子密度図を得た。この電子密度図を基に SeMet 置換体の構造モデルを構築及び精密化し (2.2Å ; 信頼度因子 $R_{\text{cryst/free}}=19.0/28.0\%$)、さらに Native 結晶の高分解能データに対して、構造モデルを精密化した (1.8Å ; $R_{\text{cryst/free}}=22.2/25.8\%$)。

P. horikoshii 由来の DNA プライマーゼは、ドイツの研究グループにより先に報告された *P. furiosus* (ref.3) と同様に、触媒ドメイン及びヘリカルドメインから成っていた (図 1)。この触媒ドメインが、触媒反応に必須と思われる酸性残基や保存されたアミノ酸がポケットを形成していることは既に推測されていたが、直接的な証拠はなかった。

そこで NTP の結合様式及び触媒反応機構を明らかにするために、Native 結晶に UTP 溶液を浸潤させる事で基質複合体を得て、その構造を 2.7Å で決定した ($R_{\text{cryst/free}}=20.4/26.8\%$)。その結果 UTP の 3 リン酸部分は、保存されたアミノ酸残基で形成された触媒部位に結合していた (図 2)。すなわち必須の触媒残基である Asp95 及び Asp97 が金属を介して 3 リン酸部分と結合し、その近傍にある Asp280 と共にヌクレオチド転位反応を行うことが考えられた (図 2 及び 3)。従って、これまで DNA ポリメラーゼの触媒機構で見られる 3 つの酸性残基と金属イオンに依存したヌクレオチド転移反応機構が、真核型プライマーゼでも行われていることが示唆された。このことはプライマーゼの 3 つの触媒残基の空間的な配置が、DNA ポリメラーゼ β (pol β)での配置に最も近いことから支持される (図 5)。さらに Arg148 も UTP の 3 リン酸部分と相互作用しており、マウスのプライマーゼでの Arg148 に相当する残基を Ala に置換すると、ヌクレオチドへの K_m 値が上昇するという結果を解釈できる (図 3)。すなわち Arg148 もまたヌクレオチドの結合及び触媒反応に重要な役割を持つことが明らかとなった。

さらに、なぜプライマーゼが最初のジヌクレオチド合成を行うことができ、そのためにどのような構造的な特徴があるのかを考察した。様々なポリメラーゼとプライマーゼの触媒部位の立体構造を比較したところ、両者には興味深い構造的な違いが存在していた。ポ

リメラーゼではプライマーの 3'-OH 末端を触媒部位に引き込むために、プライマー末端のリン酸骨格の酸素原子を、触媒残基の近くに位置するアミノ酸残基により認識している。このアミノ酸残基については必ずしも普遍性はないが、その多くはアルギニンやリジンといった塩基性側鎖やチロシンといった芳香環側鎖を持つアミノ酸残基である。例えば、pol β では Arg254がプライマー末端のリン酸骨格の酸素と相互作用し、かつ触媒残基の近くに存在している (図5)。一方 NTP がこの近くに来る場合、アルギニンの側鎖と NTP の β -及び γ -位のリン酸基が立体障害を起こすことが考えられる。しかしプライマーゼではこの Arg254 に対応する部分にはアミノ酸の側鎖は向いておらず窪みを形成している (図5)。従ってこの窪みがプライマー合成開始の際に、5'末端側の NTP の 3 リン酸部分を許容するポケットであることが考えられた。しかしこのポケットでの NTP の結合は、触媒部位での結合と異なり緊密に相互作用している可能性は少ない。また NTP のリボースや塩基部分については、pol β やその他のポリメラーゼでは見られないヘリックス構造により安定に保持されている可能性も示唆された (図5)。従って開始反応の際には、プライマーゼに特徴的なヘリックスや NTP の 3 リン酸部分を許容するスペースが 5'末端側の NTP 分子を保持することでジヌクレオチド合成を行なっていることが示唆された (図6)。

このように 5'末端側の 3リン酸を許容することで開始反応が行われる機構は、RNA ポリメラーゼでも観察され、開始反応を行うことの普遍的な機構であることが強く支持される。

本研究では、真核型プライマーゼとその NTP 複合体の構造解析からプライマー合成開始の触媒機構についてのモデルを提案することができた。これらは真核細胞 DNA 複製機構のみならず、プライマー合成開始機構についての理解をより一層深めるものであると期待される。

参考文献

- 1 Keck, J. L. *et al.*, (2000) *Science*, **287** 2482-2486
- 2 Podobnik, M. *et al.*, (2000) *J. Mol. Biol.*, **300** 353-362
- 3 Augustin, M. A. *et al.*, (2001) *Nature Struct. Biol.*, **8** 57-61
- 4 Ito, N. *et al.*, (2001) *J. Biochem (Tokyo)*. **130** 727-730.

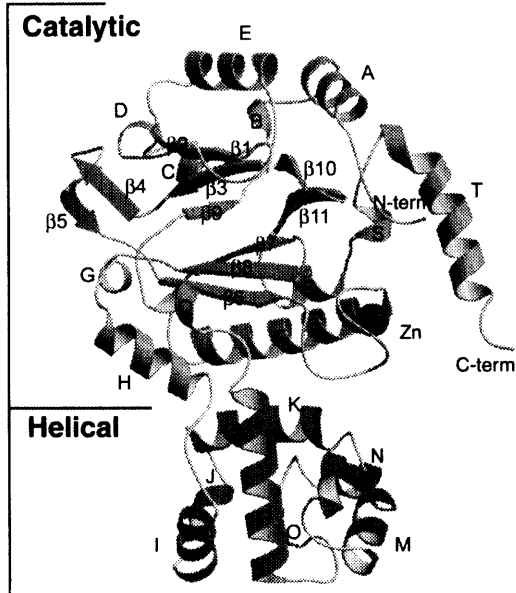


図1 *P. horikoshii* DNAプライマーゼの立体構造

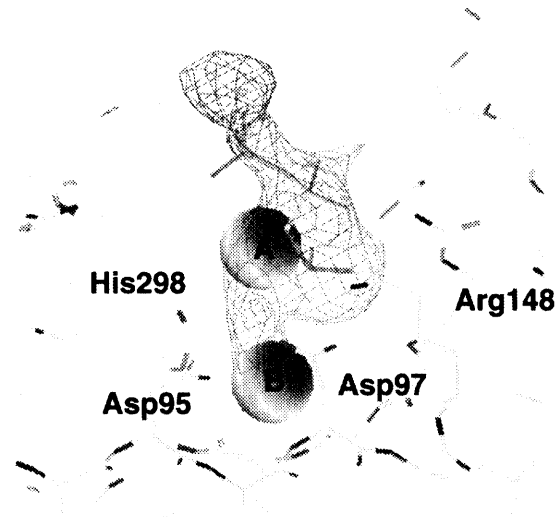


図2 触媒部位に結合したNTPのFo-Fcオミット電子密度図

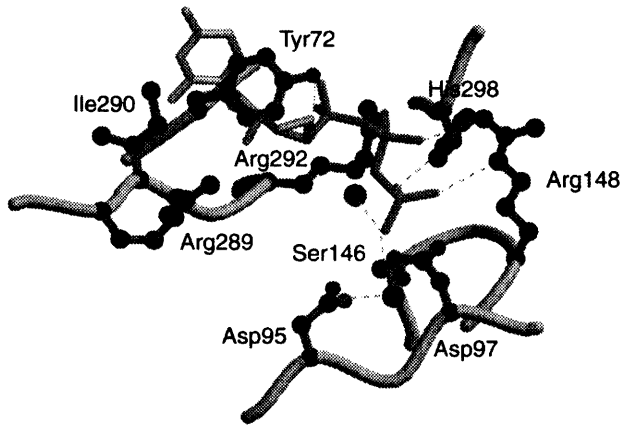


図3 プライマーゼ触媒部位でのNTP認識機構

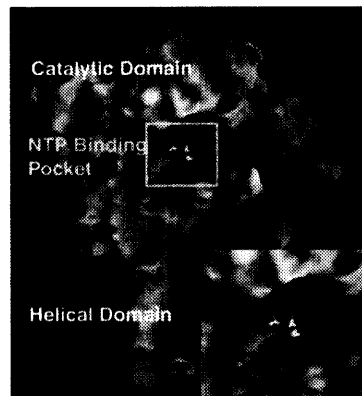


図4 プライマーゼの表面電荷図とNTP結合ポケットの位置

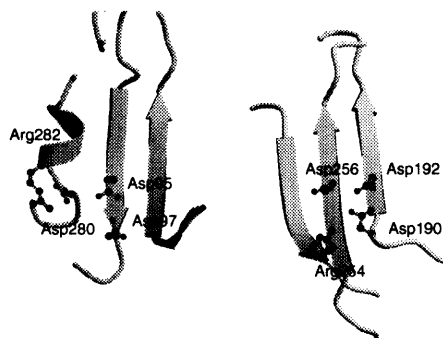


図5 プライマーゼ(左)及びpol β(右)の触媒中心付近の2次構造と触媒残基



図6 プライマー合成開始反応のモデル