

# 論文審査の結果の要旨

氏名 伊藤 晋敏

本論文は4章からなり、第1章は序論、第2章は材料と方法、第3章は結果と考察、第4章は総合討論について述べられている。

論文提出者はまず第1章において、DNA複製におけるプライマーゼの役割についてこれまでの研究背景を概説している。原核及び真核細胞の染色体DNA複製では、DNAポリメラーゼはRNA鎖からなるプライマーを利用し新生DNA合成を行っている。このRNA鎖はおよそ7から10塩基の長さから成り、DNAプライマーゼによって1本鎖DNAを鋳型として2つのヌクレオチド5'-3'リン酸(NTP)から合成される。DNAプライマーゼについては長年に渡り、生化学的及び遺伝学的な手法により機能解析が進められてきたが、その立体構造や触媒機構については不明であった。そこで論文提出者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を目的に本研究を行った。

第2章及び第3章で実験方法、結果及び考察について述べている。まず超好熱性古細菌 *P. horikoshii* DNAプライマーゼのクローニング及び発現系を構築した。次に組換えタンパク質を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  $a=b=79\text{\AA}$ 、 $c=129\text{\AA}$  であった。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。SeMet 置換体の構造モデルを構築及び精密化し (2.2 Å ; 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 (1.8 Å ;  $R_{\text{cryst/free}}=22.2/25.8\%$ )。 *P. horikoshii* 由来の DNA プライマーゼは、触媒及びヘリカルドメインで構成されていた。この触媒ドメインが触媒反応に必須の保存されたアミノ酸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、UTP 複合体の構造を 2.7 Å 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ことが明らかとなった。これらの結果から、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。

第 4 章では DNA 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することで、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合成を開始でき DNA ポリメラーゼにはできないのかという問題について考察している。その結果、DNA 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、プライマーのリン酸骨格を認識するアミノ酸残基が存在するが、プライマーゼでは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ことを見いだした。その結果プライマー合成開始の際、この窪みに NTP の 5'末端側 3 リン酸部分が許容されるモデルを提案している。この 3 リン酸を許容し開始反応が行われる機構モデルは RNA ポリメラーゼにも当てはまることができることから普遍的なモデルであることが期待される。

論文提出者による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。これらはプライマー合成開始機構のみならず、真核細胞 DNA 複製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。

なお本論文は、濡木 理、白水美香子、横山茂之、花岡文雄との共同研究であるが、論文提出者が主体となって行った研究であり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。