

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 田 中 卓

本研究は染色体複製時における複製フォーク停止をモニターするタンパク質として重要な役割を果たしていると予想される大腸菌 PriA タンパクによる停止したフォークの認識機構を明らかにするため、PriA タンパクの各ドメインの役割を決定し、停止フォーク認識に関わる分子基盤の確立を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. PriA の ATPase/helicase 活性は効率のよい組み換え依存性複製に必要とされる。

PriA の持つ DNA 依存性 ATPase/helicase 活性の、組み換え依存性複製における役割を解明するため、ATPase/helicase モチーフに点変異を導入した変異タンパク質を作製し、*priA* 欠損株に発現させ、各種細胞内機能に対する効果を観察したところ、この活性は、増殖、紫外線抵抗性などには必須でないが、組み換え依存性複製である SDR には必要であることが示された。

2. DNA 結合ドメインの同定。

停止フォークへの結合機序の解明のため、この結合ドメインを同定することを目的として、このドメインが存在すると予想される N 末端側のペプチド断片を作製し、ゲルシフトアッセイにより結合活性を調べたところ、PriA は N 末端約 180 アミノ酸のみで D-loop に結合できることが明らかにされた。しかしながら、この領域が全長タンパク質の持つ D-loop 特異性を示さなかったため、C 末端側に未知の D-loop 結合必須ドメインの存在が予想された。このドメインの検索の結果、helicase ドメイン内に 2 カ所の新規の D-loop 結合必須ドメインが同定された。これらの結果から、PriA タンパク質は N 末端の約 180 アミノ酸領域だけで DNA に結合できること、D-loop 特異的で強力な結合には C 末側の領域が協調して作用する必要があることが示された。

3. PriA による停止フォーク認識機構の解明:”3'末端結合ポケット”の提唱。

PriA は 1 本鎖 DNA に対して弱い結合能を示すが、BIAcore アッセイにより、その結合は DNA 3'末端が free である時にのみ観察されることが見出された。この事実により、PriA は、停止した複製フォークに存在すると想定される、新

生鎖の 3'末端を特異的に認識するという可能性が示唆された。そこで、停止したリーディング鎖の 3'末端が free のものとリン酸化により block されたものの二種類の停止複製フォーク構造を合成し、PriA の結合能をゲルシフトアッセイにより比較したところ、PriA は前者のみに特異的に結合し、後者には結合しないことが示された。さらに N 末端断片の NMR 解析により、3'末端と特異的に相互作用するアミノ酸残基が同定された。これらの残基は真性細菌の PriA ファミリーのタンパク質によく保存されており、この保存残基にアミノ酸置換を有する PriA 変異タンパク質は、*in vitro* で停止した複製フォークに結合できないこと、SDR、増殖能などの *in vivo* での機能を喪失することが示された。

本研究により、PriA が停止複製フォークのリーディング鎖に存在する 3'末端を特異的に認識して結合することが明らかにされ、その結合に必須のアミノ酸残基が N 末端に存在し、それらが”3'末端結合ポケット”を構成する可能性が示唆された。そして、停止複製フォークに特異的かつ安定な結合をするためには N 末端に存在するフォーク認識・結合ドメインと C 末端ヘリカーゼドメインが協調的に機能することが必要であることも明らかとなった。さらにこの結合の後、そこからの複製再開には ATPase/helicase 活性が必要であることが示された。

以上、本論文は PriA による停止した複製フォーク認識とそこからの複製再開の構造機能的基盤を解明し、その高次構造決定への重要な知見を提供するものである。また、未だ明らかになっていない、真核細胞の停止複製フォーク認識タンパク質の同定にも大きく貢献することが期待される。さらに、このような”3'末端結合ポケット”は、他の複製、組み換え、修復など核酸代謝に関わるタンパク質においても存在することが予想されることから、今後、同様な構造を有するタンパク質群が同定され、その生物学的機能が明らかにされることが期待される。本研究は停止した複製フォーク認識の分子機構の解明と、真核生物のチェックポイント機構におけるセンサータンパク質の実体とその認識機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。