

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310134

研究課題名（和文） アーキア研究による染色体DNA複製装置の機能原理の解明

研究課題名（英文） Principle of replication machinery for archaeal DNA replication

研究代表者

石野 良純（ISHINO YOSHIZUMI）

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30346837

研究成果の概要（和文）：

*Thermococcus kodakaraensis* の3種の *mcm* 遺伝子、および2種の *pcna* 遺伝子および産物の機能解析を進めた。2種の *mcm* 遺伝子と1種の *pcna* 遺伝子の破壊株の作製に成功した。それぞれ一種ずつの遺伝子は破壊株が得られず、生存に必須であることが推定された。発現させた2種の Mcm はどちらもそれら自身でヘリカーゼ活性を有していた。また、PCNA は両者共に DNA ポリメラーゼの DNA 鎖合成活性を促進した。また、*Pyrococcus furiosus* 由来のタンパク質を用いて PCNA-DNA-DNA リガーゼ複合体や PCNA-DNA-DNA ポリメラーゼ複合体、さらに、ウラシルグリコシラーゼ-DNA-AP エンドヌクラーゼ-PCNA という塩基除去修復に関わる複合体について、機能と構造の関係を議論した。

研究成果の概要（英文）：

We characterized three Mcm and two PCNA proteins from *Thermococcus kodakaraensis*. One of the three *mcm* genes and one of the two *pcna* genes seemed to be essential for the life of *T. kodakaraensis*. Furthermore, we detected the functions of Mcm and PCNA proteins *in vitro*. In addition, we made 3D structure models of PCNA-DNA ligase-DNA, PCNA-DNA polymerase-DNA, and PCNA-UDG-AP-DNA, and discussed their structure-function relationships.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：DNA replication

超好熱性アーキア、DNA複製、DNA修復、生体高分子、レプリソーム

1. 研究開始当初の背景

本研究は、第3の生物と言われるアーキア（古細菌）を用いて、その生命現象の基本原則を追求すべく、DNA複製、修復の分子機構を生化学的、遺伝学的に解析する提案をした。用いるアーキアは生命の起源により近いと考えられる超好熱性のものである。本研究に

おいては、世界に先駆けて超好熱性アーキアのDNA複製および、それと協調した修復機構の分子機構の全容解明に迫りたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的はレプリソーム複合体の構造と機

能に関する基礎的な理解であり、通常の複製時のレプリソームと DNA 障害に遭遇した複製フォークに形成されるレプリソームとのダイナミックな機能変換の分子機構を解明し、がん、遺伝病などの遺伝子異常疾患の病理と治療法の開発に役立てることである。

### 3. 研究の方法

熱安定性の高いタンパク質を産生する超好熱性アーキアを実験系として用いて、試験管内 DNA 複製、修復のモデル系構築を目指して複製関連遺伝子の網羅的な探索を行うところに本研究の特色と独創性を有する(好熱菌でも *Thermus* 属などの真正細菌とは異なる)。細胞内での機能を調べるために分担者が開発した遺伝子破壊実験を活用する。

### 4. 研究成果

アーキアの DNA 複製にとって、中心的な機能を有する Mcm, PCNA について、生化学、遺伝学を融合させた世界先端の研究が実施できた。また、超好熱性アーキア由来のタンパク質ならではの高次複合体構造の構造と機能についても最先端の研究成果が上がった。これらの成果を基盤にして、新たな展開が可能となった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Liu C, McKinney MC, Chen YH, Earnest TM, Shi X, Lin LJ, Ishino Y, Dahmen K, Cann IK, Ha T、Reverse-Chaperoning Activity of an AAA+ Protein.、*Biophys J.*、査読有、100 巻(2011)、1344-1352
- ② 真柳浩太、清成信一、西田洋一、斉藤、神田大輔、石野良純、白井剛、森川耿右、Architecture of the DNA polymerase B-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-DNA ternary complex.、*Proc Natl Acad Sci USA.*、査読有、108 巻(2011)、1845-1849
- ③ 清成信一、石野良純、DNA 複製をコントロールするクランプ複合体、*化学と生物*、査読有、49 巻(2011)、9-11
- ④ Fujikane R, Ishino S, Ishino Y, Forterre P.、Genetic analysis of DNA repair in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus*

*kodakaraensis.*、*Genes Genet. Syst.*、査読有、85 巻(2010)、243-257

- ⑤ 西田 洋一 , 真柳 浩太 , 石野 良純 , 森川 耿右、DNA クランプ/複製 DNA ポリメラーゼ複合体における DNA 合成・修正スイッチング機構、*日本結晶学会誌*、査読有、52 巻(2010)、201-207

[学会発表] (計 17 件)

1. Yoshizumi Ishino Structural and functional analyses of a DNA repair protein Hef containing a ID region between the helicase and endonuclease domains. The 1st International Symposium on Intrinsically disordered proteins. 2011. 1.27-28. Hamagin Hall "VIA MARE", Yokohama
2. 石野良純、超好熱性アーキアの複製フォーク進行と停止修復に関わる超分子複合体の構造と機能、ワークショップ「染色体複製とその制御における超高次複合体のダイナミクス」、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010. 12. 7-10、神戸ポートアイランド (神戸)
3. 石野園子、平田励、山上健、石野良純、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* の DNA 修復蛋白質 Hef の機能解析～天然変性領域を中心に～、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010. 12. 7-10、神戸ポートアイランド (神戸)
4. Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Nils-Kare Birkeland, Akihiko Yamagishi, and Yoshizumi Ishino Homotetrameric GINS from the thermoacidophilic archaean, *Thermoplasma acidophilum* 第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日

- 本生化学会大会合同大会、2010. 12. 7-10、神戸ポートアイランド (神戸)
5. 藤野誠司、石野園子、井田梨沙、尾木野弘実、富田宏矢、金井 保、跡見晴幸、真柳浩太、大山拓次、森川耿右、石野良純、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* の複製フォーク複合体解明に向けての MCM, GINS 複合体解析、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010. 12. 7-10、神戸ポートアイランド (神戸)
  6. 石野園子、平田励、 山上健、藤兼亮輔、Forterre Patrick、石野良純、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* 由来 DNA 修復蛋白質 Hef に存在する天然変性領域の解析、第 11 回極限環境生物学会年会、2010. 11. 15-16、京都大学 (京都)
  7. 江頭由里子、清成信一、石野良純、超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* 由来 Endonuclease V によるヒポキサンチン除去修復機構、第 11 回極限環境生物学会年会、2010. 11. 15-16、京都大学 (京都)
  8. 久場由真仁、石野園子、山上健、徳原将弘、金井保、跡見晴幸、石野良純、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* の PCNA2 の細胞内における役割、第 11 回極限環境生物学会年会、2010. 11. 15-16、京都大学 (京都)
  9. 藤野誠司、石野園子、富田宏矢、金井 保、跡見晴幸、石野良純、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* 由来 MCM の構造と機能、第 11 回極限環境生物学会年会、2010. 11. 15-16、京都大学 (京都)
  10. 金尾弥生、松川博昭、山上 健、石野園子、石野良純、蛋白質工学による TaqDNA ポリメラーゼの機能改変、日本農芸化学会西日本支部大会、2010. 9. 17-18、崇城大学 (熊本)
  11. 江頭由里子、清成信一、石野良純、*Pyrococcus furiosus* 由来 endonuclease V の機能解析、日本農芸化学会西日本支部大会、2010. 9. 17-18、崇城大学 (熊本)
  12. 平田励、石野園子、山上健、藤兼亮輔、Patrick Forterre、石野良純、アーキアの DNA 修復関連蛋白質 Hef の構造と機能について、日本農芸化学会西日本支部大会、2010. 9. 17-18、崇城大学 (熊本)
  13. 石野良純、DNA 修復タンパク質 Hef ～その発見から現在まで～ (特別講演)、日本 Archaea 研究会第 23 回講演会、2010. 7. 9-10、名古屋大学 (名古屋)
  14. 尾木野弘実、石野園子、真柳浩太、Nils-Kare Berkeland、山岸明彦、石野良純、ホモログが一種のみ存在するアーキアの DNA 複製関連複合体 GINS の解析～*Thermoplasma acidophilum* GINS を例として～、日本 Archaea 研究会第 23 回講演会、2010. 7. 9-10、名古屋大学 (名古屋)
  15. 石野良純、DNA 複製フォーク進行停止の修復に関わる天然変性蛋白質、ワークショップ「天然変性タンパク質研究が目指すサイエンス」第 10 回日本蛋白質科学会 6. 16-18、札幌コンベンションセンター (札幌)
  16. 石野園子、高尾宏一、井田梨沙、尾木野弘実、藤野誠司、富田宏矢、金井保、跡見晴幸、大安裕美、石野良純、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* に存在する 3 種類の Mcm ホモログ、第 10 回日本蛋白質科学会、2010. 6. 16-18、札幌コンベンションセンター (札幌)
  17. 久場 由真仁、石野園子、山上健、徳原将弘、金井保、跡見晴幸、大安裕美、石野良純、超好熱性アーキア *Thermococcus*

*kodakaraensis* の二種類の PCNA の機能  
解析、第 10 回日本蛋白質科学会、  
2010. 6. 16-18、札幌コンベンションセン  
ター（札幌）

〔図書〕（計 1 件）

Ishino S., Ishino Y. Application of environme  
ntal DNA resources to create useful DNA pol  
ymerases with different properties. In *Microbe  
s in Environmental Management and Biotechn  
ology*, Springer, 2011

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石野 良純 (ISHINO YOSHIZUMI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：3 0 3 4 6 8 3 7

### (2) 研究分担者

跡見 晴幸 (ATOMI HARUYUKI)  
京都大学・工学研究科・教授  
研究者番号：9 0 2 4 3 0 4 7