

学位論文題名

# ヒト増殖細胞核抗原（PCNA）の構造と機能の解析

## 学位論文内容の要旨

序論—増殖細胞核抗原（PCNA）は、DNA polymerase  $\delta$  (pol  $\delta$ ) の補助因子として機能し、真核細胞のDNA複製に必須な蛋白質である。著者は、ヒトPCNAの高次構造ならびに活性部位に関する情報を得るため、蛋白質工学的手法によって各種変異体を作製し、その機能に対する影響を解析した。得られた結果を近年解析された出芽酵母PCNAの三次構造の情報と合わせて考察した。

1. PCNA変異体の構築および発現—構築したPCNAの変異体は、1. 4種類のN末端またはC末端欠失変異体、2. 30種類の酸性もしくは塩基性アミノ酸をアラニンに変換した部位特異的変異体の計34種類である。PCRによる部位特異的変異法によって各種PCNA変異体発現用プラスミドを構築し、変異体蛋白質の発現および精製を行った。この段階で、 $\Delta 2-9$ および $\Delta 250-261$ においては、抽出液中に目的の蛋白質が同定されなかった（封入体の形成）。さらに、ゲルろ過を用いた精製においても他の変異体蛋白質とはその溶出される挙動が異なっていた（三量体形成能の欠失）。出芽酵母PCNAのX線結晶解析から、欠失されたアミノ酸残基は、リング構造の外枠を構成する $\beta$ -シートの一部を含んでおり、その欠落が分子構造に影響を及ぼしたと考えられた。

2. PCNA変異体によるReplication Factor C (RF-C) のATPase活性およびpol  $\delta$  のDNA合成の活性促進効果—RF-Cは、ATP存在下でプライマーの3'末端に特異的に結合する複製蛋白質の1つであり、PCNAはRF-CのATPase活性を促進する機能を持っている。3'末端におけるRF-CとPCNAの複合体形成は、holoenzyme形成過程の初期段階におこり、PCNAによるRF-CのATPase活性促進の変動が、直接の相互作用を反映することになる。pol  $\delta$ はPCNAによってそのprocessivityが上昇するが、その活性にはPCNAの有する2つの機能、1. pol  $\delta$ とPCNA間の直接の相互作用、2. PCNAとDNA間の相互作用に依存することになる。そこで著者は精製した34種類のPCNA変異体を用い、RF-CのATPase活性およびpol  $\delta$ のDNA合成の活性促進効果について検討した。

その結果、 $\Delta 2-9$ および $\Delta 250-261$ においては、両者の活性促進効果が見られなかった。これは両変異体蛋白質の抽出や精製の段階で予想されていた通り、本来維持している高次構造が失われたことが起因していると考えられる。

3. PCNAのC末端ループとRF-Cの相互作用— $\Delta 257-261$ と $\Delta 254-261$ においては、pol  $\delta$ のDNA合成の促進効果が野生型と同様に見られた。しかし、RF-CのATPase活性の促進効果においては、 $\Delta 257-261$ が野生型と変わらなかったのに対し、 $\Delta 254-261$ はその効果を示さなかった。このことからPCNAの

Lys254-Ile255-Glu256のアミノ酸残基が、RF-CのATPase 活性の促進効果に関与していることが明らかになった。さらにこの領域について詳しく解析した結果、255番目のイソロイシンがこの促進効果に関与していることが示唆された。この領域は、出芽酵母PCNAのX線結晶解析の結果からループとして全体の構造から突出しており、この部分がRF-Cと直接相互作用していると推定された。

4. PCNAのリング構造の内側に位置する  $\alpha$ -ヘリックスとDNAの相互作用—塩基性アミノ酸をアラニンに変換した変異体について、pol  $\delta$ のDNA合成促進効果について調べた。その結果、Lys13、Lys14、Lys20、Lys77、Lys80、Arg146、Arg149、Arg210、Lys217をアラニンに変換した変異体においては、野生型に対してほとんどその活性を失っていた。またArg64、Lys80、Lys110、Lys168、Arg210をアラニンに変換した変異体においても、部分的にその活性が弱まっていた。

上記の塩基性アミノ酸の一群は、出芽酵母PCNAのX線結晶解析の結果から判明したリング構造の内側の $\alpha$ -ヘリックス領域にほぼ一致（ $\alpha$ A1：Lys13、Lys14、Lys20、 $\alpha$ B1：Lys77、Lys80、 $\alpha$ A2：Arg146、Arg149、 $\alpha$ B2：Arg210、Lys217）していた。よってこれら塩基性アミノ酸が、DNA と相互作用するのに重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらにpol  $\delta$ によるDNA合成反応の生成物について解析した結果、 $\alpha$ -ヘリックス上の塩基性アミノ酸はおもにpol  $\delta$ の合成反応の初期の段階、つまりDNA clamping 活性として機能すると考えられた。また、4つの $\alpha$ -ヘリックス上の塩基性アミノ酸を2箇所同時にアラニンに変換した変異体について同様に解析した結果、これらが協調的にDNA clamping 活性として機能していることが判明した。

5. PCNAとpol  $\delta$ の相互作用—酸性アミノ酸をアラニンに変換した変異体についてpol  $\delta$ のDNA合成促進効果について調べたところ、Asp41→AlaとAsp122→Ala 変異体においては、野生型に対して部分的な活性の低下を示した。以上の結果から、Asp41、Arg64、Lys110、Asp122そしてLys168が、pol  $\delta$ のDNA合成促進効果に重要なアミノ酸として同定された。出芽酵母PCNAの三次構造と比較するとAsp41、Arg64そしてAsp122は $\beta$ -シート構造を連結し、かつリング構造の同じ表面から突出しているループ上に存在していた。よってこれらのアミノ酸残基が、pol  $\delta$ と直接相互作用していることが示唆された。

6. PCNAとRF-Cの相互作用—酸性アミノ酸をアラニンに変換した変異体について、RF-CのATPase 活性の促進効果について調べた。Asp41→Ala 変異体は、野生型に対してほとんどその活性を失っており、またAsp97→Ala 変異体においては50-80%の活性を示した。

出芽酵母PCNAの三次構造上における位置を検討した結果、Asp41、Asp97はC末端ループと同様に $\beta$ -シート構造間を連結し、リング構造の同じ表面から突出しているループ上に存在していた。よってこれらのアミノ酸残基は、C末端ループとともにRF-Cと直接相互作用していることが示唆された。

まとめ—PCNAが特徴的なリング構造を形成することによって、多彩な機能をもった分子表面を提供していることが明らかになった。さらに、pol  $\delta$ 、RF-Cとともに構成されるholoenzyme形成過程のメカニズム解明への糸口を見出した。

## 学位論文審査の要旨

主 査	教 授	大 塚 栄 子
副 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	助教授	加 藤 宏 幸
副 査	助教授	井 上 英 夫

### 学 位 論 文 題 名

## ヒト増殖細胞核抗原 ( PCNA ) の構造と機能の解析

申請者は、増殖細胞核抗原 ( PCNA ) の高次構造ならびに活性部位に関する研究を行っていたが、今回蛋白質工学的手法によって各種変異体を作製し、その機能に対する影響を解析した。得られた結果を近年解析された出芽酵母PCNAの三次構造の情報と合わせて考察した。

構築したPCNAの変異体は、1. 4 種類のN末端またはC末端欠失変異体、2. 36種類の酸性もしくは塩基性アミノ酸をアラニンに変換した部位特異的変異体の計40種類である。PCRによる部位特異的変異法によって各種PCNA変異体発現用プラスミドを構築し、変異体蛋白質の発現および精製を行った。

この段階で、 $\Delta 2-9$ および $\Delta 250-261$ においては、抽出液中に目的の蛋白質が同定されなかった（封入体の形成）。さらに、ゲルろ過を用いた精製においても他の変異体蛋白質とはその溶出される挙動が異なっていた（三量体形成能の欠失）。出芽酵母PCNAのX線結晶解析から、欠失されたアミノ酸残基は、リング構造の外枠を構成する $\beta$ -シートの一部を含んでおり、その欠落が分子構造に影

響を及ぼしたと考えられた。

PCNA変異体によるReplication Factor C (RF-C)のATPase 活性およびpol  $\delta$ のDNA合成の活性促進効果を調べたところ、2-9および250-261を欠失したものは、両者の活性促進効果が見られなかった。これは両変異体蛋白質の抽出や精製の段階で予想されていた通り、本来維持している高次構造が失われたことが起因していると考えられる。

257-261と254-261欠失体においては、pol  $\delta$ のDNA合成の促進効果が野生型と同様に見られた。RF-CのATPase 活性の促進は、257-261欠失体が野生型と変わらなかったのに対し、254-261欠失体はその効果を示さなかった。このことからPCNAのLys254-Ile255-Glu256のアミノ酸残基が、RF-CのATPase 活性の促進効果に関与していることを明らかにした。

出芽酵母PCNAのX線結晶解析の結果から、この領域はループとして全体の構造から突出しており、この部分がRF-Cと直接相互作用していると推定された。

部位特異的変異体について、RF-CのATPase 活性の促進効果について調べた。その結果、Asp41→Alaは、野生型に対してほとんどその活性を失っており、またAsp97→Alaにおいては50-80%の活性を示した。

出芽酵母PCNAの三次構造上における位置を検討した結果、Asp41、Asp97はC末端ループと同様に $\beta$ -シート構造間を連結し、リング構造の同じ表面から突出しているループ上に存在していた。よってこれらのアミノ酸残基は、C末端ループとともにRF-Cと直接相互作用してい

ることが示唆された。

次にPCNAのリング構造の内側に位置する $\alpha$ -ヘリックスとDNAの相互作用を調べるために、塩基性アミノ酸をアラニンに変換した変異体について、pol  $\delta$ のDNA合成促進効果について調べた。その結果、Lys13、Lys14、Lys20、Lys77、Lys80、Arg146、Arg149、Arg210、Lys217をアラニンに変換した変異体においては、野生型に対してほとんどその活性を失っていた。またLys80、Arg210をアラニンに変換した変異体においても、部分的にその活性が弱まっていた。これらの塩基性アミノ酸は、出芽酵母PCNAのX線結晶解析の結果から判明したリング構造の内側の $\alpha$ -ヘリックス領域にほぼ一致

( $\alpha$ A1 : Lys13、Lys14、Lys20、 $\alpha$ B1 : Lys77、Lys80、 $\alpha$ A2 : Arg146、Arg149、 $\alpha$ B2 : Arg210、Lys217) していた。よってこれら塩基性アミノ酸が、DNAと相互作用するのに重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらにpol  $\delta$ によるDNA合成反応の生成物について解析した結果、 $\alpha$ -ヘリックス上の塩基性アミノ酸はおもにpol  $\delta$ の合成反応の初期の段階、つまりDNA clamping活性として機能すると考えられた。また、4つの $\alpha$ -ヘリックス上の塩基性アミノ酸を2箇所同時にアラニンに変換した変異体について同様に解析した結果、これらが協調的にDNA clamping活性として機能していることが判明した。

上記以外の塩基性アミノ酸または、酸性アミノ酸をアラニンに変換した変異体についてpol  $\delta$ のDNA合成促進効果について調べた。その結果、Asp41、Arg64、

Lys110、Asp122そしてLys168が、pol  $\delta$ のDNA合成促進効果に重要なアミノ酸として同定された。出芽酵母PCNAの三次構造と比較するとAsp41、Arg64そしてAsp122は $\beta$ -シート構造を連結し、かつリング構造の同じ表面から突出しているループ上に存在していた。よってこれらのアミノ酸残基が、pol  $\delta$ と直接相互作用していることが示唆された。

したがって申請者は、PCNAが特徴的なリング構造を形成することによって、多彩な機能をもった分子表面を提供していることを明らかにした。さらに、pol  $\delta$ 、RF-Cとともに構成されるholoenzyme形成過程のメカニズム解明への糸口を見い出した。

この研究は博士（薬学）の学位を受けるに値するものと認めた。