

## 論文内容の要旨

博士論文題目 フラップエンドヌクレアーゼ 1 と PCNA の相互作用の構造的基礎

Structural basis for recruitment of flap endonuclease-1 to PCNA

氏名 櫻井 滋

(論文内容の要旨)

フラップヌクレアーゼ 1 (flap endonuclease-1; FEN1) は、DNA 合成の過程で生成する RNA-DNA プライマーや、DNA の修復の過程で生じる flap DNA、二本鎖 DNA から枝分かれして突出した一本鎖 DNA、を切除する酵素であり、ゲノム維持において極めて重要な役割を担っている。しかしながら、ヒトを含む真核生物由来の FEN1 の三次元分子構造は未知であり、どのように flap DNA を認識して、正確にその部位でのみ flap DNA 鎖を切断するかは謎のままである。また、FEN1 は DNA クランプとして知られている増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) と結合して、その酵素活性を大幅に促進するが、そのメカニズムも理解されていない。

本論文では、ヒト FEN1 と PCNA との複合体の結晶構造を決定して、FEN1-PCNA 相互作用の詳細を明らかにするとともに、真核生物由来の FEN1 の構造的特徴、flap DNA との構造特異的相互作用ならびに PCNA における活性促進のメカニズムについての構造的基礎を明らかにした。

構造決定の結果、真核生物由来の FEN1 に特徴的な C 末端領域は、2 本の  $\beta$  ストランドが 1 本の短いヘリックスで繋がった  $\beta$ A- $\alpha$ A- $\beta$ B モチーフを形成して、PCNA との  $\beta$  シート形成や疎水的相互作用に関与することが判明した。この相互作用は以前に構造解析されたサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク質 p21<sup>CIP1/WAF1</sup> と FEN1 との相互作用によく似ていたが、FEN1 全長を含む今回の構造では、FEN1 のコアドメインを介した PCNA との付加的な相互作用も存在することも明らかにした。分子境界でのこの相互作用は、FEN1 を不活性な状態の配向に維持するとともに、PCNA の中央の穴を保持することによって、DNA 上を高速に移動するのに利用されていると考えられる。FEN1 のコアドメインと C 末端との間に存在していたヒンジ領域は、FEN1 や他の PCNA 結合タンパク質の活性の切替えに重要であることを示した。

(論文審査結果の要旨)

本論文は、DNA 合成や修復の過程で生じる flap DNA を切除する重要な酵素であるヒト由来のフラップヌクレアーゼ 1 (flap endonuclease-1; FEN1) の酵素機能と、増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) による FEN1 の活性制御のメカニズムについて構造生物学の立場からの解明を目指した研究である。著者は、両タンパク質の大量調製と、FEN1-PCNA 複合体ならびに FEN1-PCNA-DNA 複合体の結晶化に成功している。タンパク質化学的な手法により両タンパク質や複合体の物理化学的な性質を解析するとともに、前者については、X線結晶構造解析の手法を駆使して構造決定に成功している。得られた三次元構造に基づいて、FEN1 本体や FEN1-PCNA 複合体について報告されてきた膨大な量の生化学的な実験データを説明することを試みている。本論文の主な成果は以下のように要約される。

1. 真核生物由来の FEN1 の三次元構造を世界に先駆けて明らかにして、古細菌由来等のものとの違いを明らかにした。特に、5'-flap DNA を捕らえると考えられているクランプループ、3'-flap DNA の結合に関与する $\alpha$ 2- $\alpha$ 3 ループ、ならびに C-末端のテールに大きな構造的差異がある。
2. FEN1 分子表面の特徴とこれまで報告されている生化学的、構造学的データを用いて、flap DNA との複合体モデルを構築することにより特異的相互作用の構造的基礎を明らかにした。
3. FEN1 と PCNA との分子間相互作用の詳細を解明した。特に、この分子間相互作用には、FEN1 の C-末領域ペプチドと PCNA との相互作用と、FEN1 のコアドメインと PCNA とのタンパク質-タンパク質相互作用の二種類あることを明らかにした。
4. FEN1 のコアドメインと PCNA に強く結合した C-末領域ペプチドとの間には 4 残基からなるループがあり、コアドメインと PCNA リングとの相対位置を変えるヒンジとして機能していることを明らかにした。
5. ヒンジによる FEN1 コアドメインの位置調節は、FEN1-PCNA 複合体が二本鎖 DNA 上を高速に移動して flap DNA を探し当てたり、flap DNA 部位での酵素-基質複合体の形成、更には他の PCNA 結合タンパク質の活性の切替えに重要であることを示した。

本論文は、FEN1-PCNA のタンパク質複合体の三次元構造解析を成功させることによって、FEN1 の DNA 構造特異的な酵素メカニズムや PCNA の酵素作用の制御メカニズムの構造的基礎を確立しており、理学、特に、DNA 複製や修復ならびにゲノム維持の構造生物学の分野において学術上の寄与が十分である。よって、博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。