

特集：極限環境で働くタンパク質の特徴と利用

耐熱性クランプ分子 ～環状構造の安定性と機能の関係～

石 野 園 子, 石 野 良 純

スライディングクランプ分子は環状構造を形成して DNA を挟み込み、その表面で DNA ポリメラーゼと結合して DNA 上に酵素を繋ぎとめることにより、DNA 鎖合成反応を促進する複製補助因子である。真核生物およびアーキアでは PCNA (proliferating cell nuclear antigen) が三量体で環状構造を形成する。筆者らは *P. furiosus* 由来 PCNA (PfuPCNA) の結晶構造から、分子間に働くイオン対が環状構造の安定性の維持に重要であることを見出した。そして、環状構造の安定性を変えることによって、*in vitro* における DNA 合成反応の促進作用を制御できることを発見した。野生型では増幅反応にとってむしろ阻害的に働く PCNA が、環状構造の安定性を下げる変異の導入によって、劇的に促進作用を発揮することを見出した。このことを利用して PCNA を PCR に利用することに成功した。

1. は じ め に

極限環境に生育する微生物の中で超好熱菌は 100℃ に近い環境で生命活動を営んでいる。したがって産生されるタンパク質は *in vitro* において「耐熱性」という利用価値の高い性質をもつものが多い。耐熱性タンパク質が活躍している分野は多岐にわたるが、その中の代表的なものに PCR がある。ごく微量の DNA を増幅させることができる PCR の利用は基礎研究分野にとどまらず、生物学的検査方法として微生物やウイルスの検出、遺伝子疾患の診断、DNA 鑑定による個人識別や品種の鑑定等、その応用範囲は拡大し続けている。

PCR の主役は耐熱性 DNA ポリメラーゼ¹⁾であるが、このタンパク質は超好熱菌の細胞内では DNA 複製や修復という生命活動に不可欠な機構の中心で働いている。例え

ば、DNA ポリメラーゼが鋳型 DNA 鎖に対して、効率よく相補鎖を合成していく際に、DNA ポリメラーゼが DNA 鎖から滑り落ちないように留めておくためにクランプ（スライディングクランプ）分子が働き、そのクランプ分子を DNA 鎖に乗せる役割を担うクランプローダーが存在する（図 1a）²⁾。この連続的な DNA 鎖合成を担う 3 種の分子を、三つの生物ドメイン（真正細菌、真核生物、アーキア）について表 1 にまとめた。真正細菌と真核生物の各分子はそれぞれ独立に研究されて同定されてきたものであり、名称も全く異なるが、アーキアは、真核生物の増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen: PCNA), replication factor C (RFC) に類似した配列を有するタンパク質を機能解析することによって同定されたものであり、同様の名称で呼ばれる²⁾。

細胞内の DNA 複製、修復、組換えには様々なタンパク質が関わっており、複雑に協調しながらゲノムの安定性を維持するために働いている。真核生物およびアーキアでは、ゲノム DNA に働きかける多くの重要なタンパク質が機能する過程に PCNA が関与している。PCNA は三量体で環状構造を形成し、その環の中心に DNA を挟み込むとともに、DNA ポリメラーゼのように DNA 鎖に作用するタンパク質と結合して DNA 上に繋ぎとめるクランプの役

九州大学大学院農学研究院蛋白質化学工学分野 (〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1)

Thermophilic sliding clamp~relationship between ring stability and functions~

Sonoko Ishino and Yoshizumi Ishino (Graduate School, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka 812-8581, Japan)

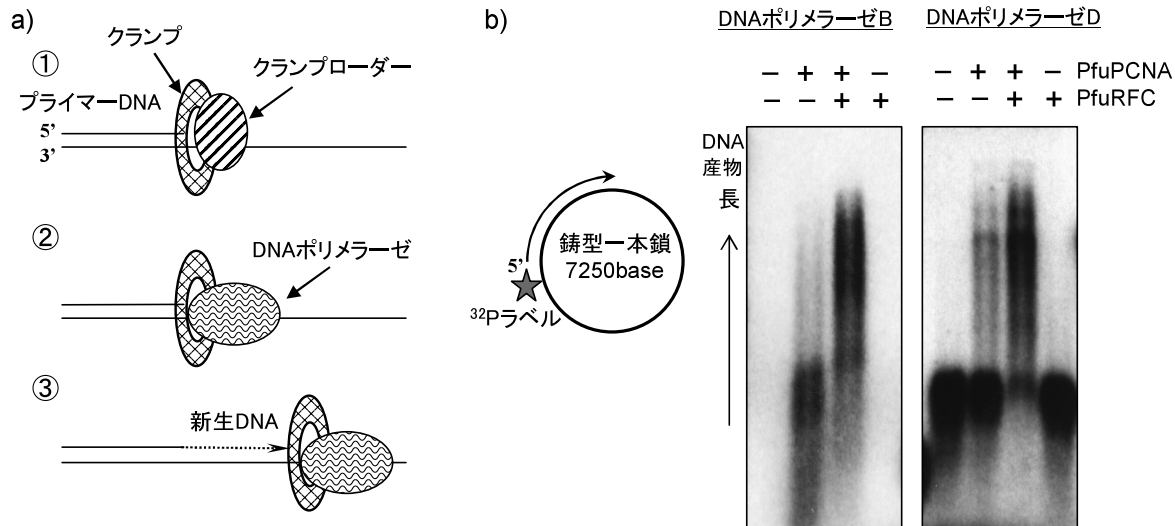


図1 クランプ分子による DNA 鎖合成反応の促進効果
a) 連続的な DNA 鎖合成反応モデル。
① クランプローダーがクランプを DNA 上にはめ込む。
② DNA ポリメラーゼがクランプと結合する。
③ 複合体が連続的に新生鎖を合成する。
b) *P. furiosus* の DNA ポリメラーゼによる DNA 鎖合成反応に対する PfuPCNA および PfuRFC の促進効果。
M13 ファージの一本鎖 DNA に³²P で放射標識したプライマーを貼付けてプライマー伸長反応を行い、アルカリアガロースゲル電気泳動で分離した結果をオートラジオグラフィーで可視化した。

表1 連続的な DNA 鎖合成反応に関わるタンパク質

機能	真正細菌	アーキア	真核生物
DNA 合成	Pol III	Pol B, Pol D	Pol σ, Pol ε
クランプ	Pol III β サブユニット	PCNA	PCNA
クランプ ローダー	Pol III γ サブユニット	RFC	RFC

割をしている。PCNA が常に安定な環状構造をとって存在するならば、DNA 鎖にはめ込むためには、その環状構造を一度開く必要があり、その際にクランプローダーがその機能を担う。RFC は ATP の結合と加水分解を伴って構造変化を起こし、PCNA を開環させると考えられている²⁾。ところが、多くの超好熱性アーキアでは、*in vitro*において PCNA は単独でもある程度は DNA 鎖上に正しく乗る（セルフローディング）ことができる³⁾。筆者らはこれまでに超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* 由来の PCNA (Pfu-PCNA) について詳細な機能および構造解析を進めてきた³⁻¹³⁾。*P. furiosus* には DNA 複製酵素と考えられる Pfu-PolB および PfuPolD の二つの DNA ポリメラーゼが存在する^{14,15)}。それぞれの酵素による DNA 合成反応に PfuPCNA を加えることでそれらの活性は明らかに促進される^{3,6,16)}。また、PfuRFC は PfuPCNA による PfuPolB および PfuPolD の DNA 合成活性の促進効果をさらに増大させることから⁵⁾、*in vitro* では PfuPCNA は単独でも DNA 上に乗ること

ができるが、細胞中では PfuRFC がクランプローダーとして働き、効率よく PfuPCNA を DNA 上にローディングしていると予想される (図 1b)。

クランプ分子については分子生物学的に数多くの研究が進められており、PCNA と相互作用して機能する多くの複製関連、修復関連因子が知られている¹⁷⁾。これらの PCNA 結合タンパク質には共通性の高いアミノ酸配列 (PCNA-interacting protein (PIP) ボックス: Qxx(L/I/M)xxF(F/Y) (x 位は不特定のアミノ酸)) が存在し、いくつかのタンパク質について、実際に PIP ボックス部位によって PCNA と結合することが結晶構造解析や変異体解析によって明らかにされている⁷⁾。PCNA は DNA に作用する様々なタンパク質と相互作用することから、PCNA を介した DNA 代謝過程においては巧妙な制御が働いていることが想像されるものの^{18,19)}、複数のタンパク質がどのようにして順序よく PCNA 上で働くのかという疑問に答えるための分子機構の解明はまだ長い道のりである。

前述したように、PCR に用いられる耐熱性 DNA ポリメラーゼの一つに PfuPolB があり (市販名は *Pfu* DNA polymerase)、クランプ PfuPCNA は *in vitro* において PfuPolB の DNA 合成 (プライマー伸長反応) を促進するものの、Pfu-PCNA の PCR への応用は今までなされていなかった。また、他の耐熱性 DNA ポリメラーゼに対してもクランプ分子を実用的に PCR に応用した成功例はこれまでにない。本稿では、耐熱性クランプである PfuPCNA の構造と機能

の関係について解析した結果、特に環状構造の安定性と DNA 鎖合成反応の促進作用の関係を詳細に理解することに繋がり、その結果 PfuPCNA の環状構造の安定性を制御することによってクランプ分子を実用的に PCR に応用できるようになったことを、実験結果と共に紹介する。

2. PCNA の立体構造

筆者らは 2001 年にアーキアのクランプとして初めて PfuPCNA の結晶構造を発表した⁴⁾。その構造をそれまでにわかっていた大腸菌の PolIII β サブユニット (β -クランプ)、ヒト PCNA の構造と比較してみると、図 2 のように三者の立体構造は極めて類似していることがわかる。大腸菌の β -クランプは二量体で環状構造を形成しているが、この構造と三量体で環状構造を形成している PCNA の構造を比較すると、類似したドメイン構造がみられ、このユニットが 6 個集まり環状構造が形成されていることがわかる。このリングは中央部に約 35 Å の穴をもっており、直径約 20 Å である二本鎖 DNA がリング内で立体障害なしに相互作用することができる。これまでに知られている全ての PCNA の環状構造は、サブユニットの C 末端側が、隣り合った分子の N 末端側に繋がる「head-to-tail」接続で形成される。

超好熱性アーキア由来の PfuPCNA の特徴は耐熱性であることであるが、それを支持する構造上の特徴としては、サブユニットタンパク質の大きさ (249 アミノ酸) がヒト (261 アミノ酸) や酵母 (258 アミノ酸) に比べて小さく、その差は 3 箇所のループ部分が短いことである。また、アミノ酸組成を比べると、PfuPCNA は耐熱性タンパク質に見られる傾向である、電荷アミノ酸の割合が高く、非電荷や極性アミノ酸の割合が低いという特徴を示す。さらに、熱安定性に大きく影響すると考えられる分子内、および分子間イオン対形成について見ると、酵母やヒトの PCNA

がサブユニットあたりそれぞれ 9 対、13 対しか無いのに対して、PfuPCNA は 27 対も存在する。このイオン対の多さは、PfuPCNA の耐熱性に大きく貢献しているものと考えられる。そして、以下に述べるように PCNA 環状構造の安定性に影響を与えるサブユニット間のイオン対を比べると、酵母、ヒトが 2 対、5 対であるのに対して PfuPCNA には 10 対観察される⁴⁾。このイオン対ネットワークは後述するように、高温においても PfuPCNA が正しい環状構造をとって機能することを支持する要素の一つになっているが、超好熱菌由来の PCNA でもサブユニット間のイオン対形成が少ないものもあり²⁰⁾、分子間イオン対の増加は必ずしも耐熱性 PCNA に共通の性質ではない。

3. 環状構造の安定性に寄与する構造因子

アーキアと真核生物の PCNA の構造は特に高い類似性を示すものの、*P. furiosus* のそれぞれのサブユニット境界面を詳細に観察すると、様々な特徴が観察できる。PCNA の三量体構造形成にはサブユニット間の逆平行 β シートにおける水素結合 (N-O distance < 3.3 Å) が寄与しており (図 3a)、環状構造の外側に形成されるその水素結合の数が PfuPCNA では 4 組であり、真核生物 PCNA の場合 (ヒト PCNA の場合が 8 組、酵母 PCNA の場合が 7 組) に比べてほぼ半減している⁴⁾。このことから、PfuPCNA は真核生物の PCNA と比べてサブユニット間相互作用が弱いことに加えて、高温環境下では、三量体構造の安定性がより低下する。*in vitro* においてクランプローダーが存在しない条件下でも PfuPCNA がセルフローディングによって正しく DNA 鎖にアクセスし、DNA 合成反応を促進することが観察されるのもそのことが一因であると考えられる。

PCNA リングの外側でこのような水素結合が観察されるのに対して、リングの内側では、境界面において N 末端側ドメインには正に荷電するアミノ酸が (Arg82, Lys84,

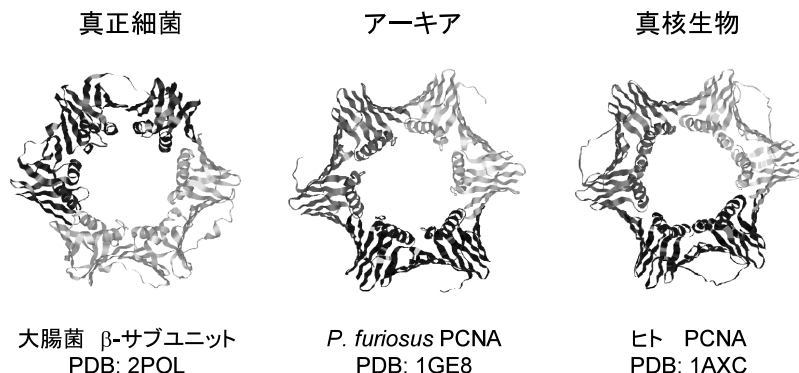


図 2 三つの生物ドメイン由来クランプ分子の結晶構造

大腸菌の PolIII β -サブユニットはホモ二量体、*P. furiosus* とヒトの PCNA はホモ三量体でそれぞれ同じ大きさの環状構造を形成している (それぞれの結晶構造の PDB 登録番号を記載した)。

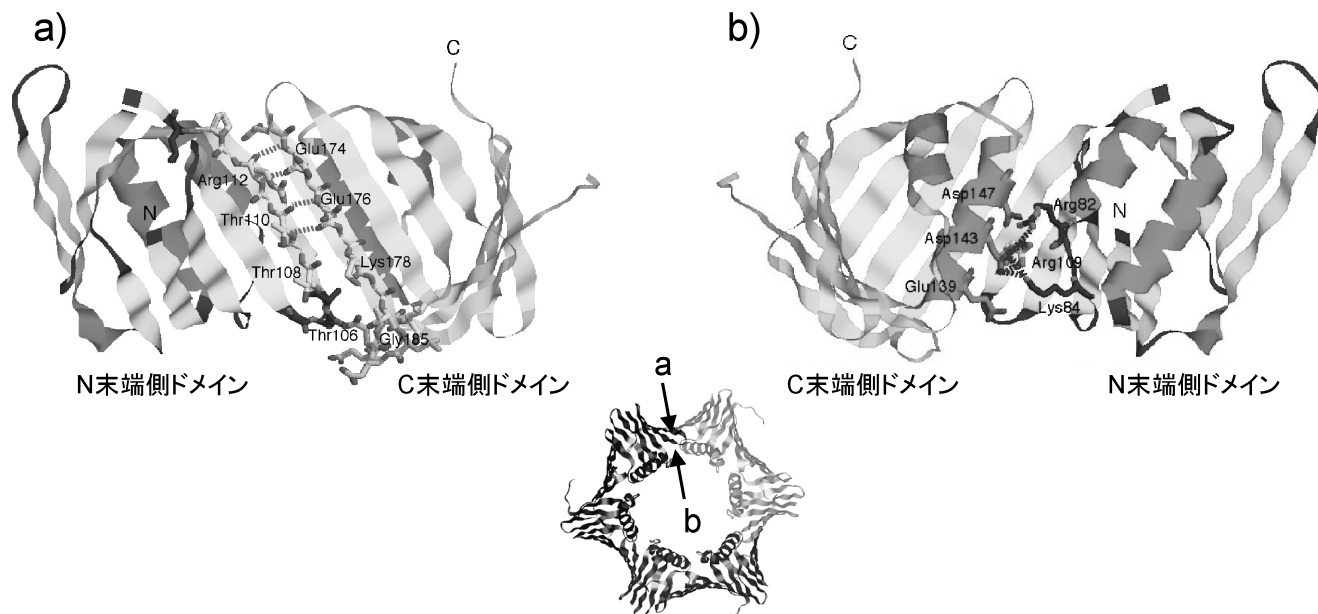


図3 PfuPCNA のサブユニット境界面の構造

- a) リング外側の逆平行 β シート間に形成される水素結合。
 b) リング内側の境界面の α ヘリックス内に見られるイオン対ネットワーク。

Arg109), C 末端側ドメインには負に荷電するアミノ酸 (Glu139, Asp143, Asp147) が分布しており, これらがイオン対ネットワークを形成している (図 3b)⁷⁾. 前述のように, このイオン対ネットワークが PfuPCNA の特徴であるので, これが PfuPCNA の環状構造形成に果たす役割を調べるために, PfuPCNA の Asp143 および Asp147 を Ala に置換した変異体 (D143A, D143A/D147A), Asp143 を逆電荷の Arg に置換した変異体 (D143R) を作製し, 構造および機能解析を行った. ゲルろ過クロマトグラフィーによって溶液中での分子の会合状態を解析すると, 野生型 PfuPCNA が三量体の分子量に相当する位置に溶出される条件において, 変異型 PfuPCNA は全て単量体の分子量に相当する位置に溶出された (図 4a)⁸⁾ (投稿準備中). また, 変異型 PfuPCNA の結晶構造解析の結果では, イオン対ネットワークが崩れたことでサブユニット間の結合様式が変化し, C 末端側どうしが結合した V 字型二量体構造が得られた⁸⁾. これらの結果は, D143, D147 が関与するイオン対形成が PfuPCNA の正しい環状構造形成に大きく寄与していることを示している.

変異型 PfuPCNA は, 環状構造の不安定化により, DNA ポリメラーゼの DNA 鎖伸長反応を促進しないであろうと予想された. 変異型 PfuPCNA の 2 種 (D143A, D143A/D147A) を野生型 PfuPCNA と比べてみたところ, 変異型 PfuPCNA (D143A/D147A) は予想通りであったが, 驚いたことに, 変異型 PfuPCNA (D143A) は野生型 PfuPCNA よりもより強く DNA 鎖合成を促進した⁸⁾. この結果から, 筆者らは PfuPCNA の環状構造の安定性とクランプ分子と

しての機能の関係をより詳細に調べようと考えた.

PfuPCNA の環状構造の安定性はサブユニット境界面のイオン対ネットワーク形成と直接関係することが示されたので, 環状構造の形成は, 溶液中のタンパク質濃度および溶液のイオン強度に強く影響を受けるであろうと予想された. 種々の条件下でゲルろ過クロマトグラフィーを行うことによってオリゴマー形成能を分析するうちに, まず, 野生型 PfuPCNA を用いたゲルろ過クロマトグラフィーの結果に示すようにタンパク質濃度が低くなるにつれてピークの溶出位置がより低分子量側にシフトし, 三量体環状構造が崩れていくことがわかった (図 4b). また同じタンパク質濃度の場合は溶液の塩濃度が高くなるにつれてピークの溶出位置がより低分子量側にシフトし, 三量体環状構造を維持できなくなると考えられた. そして, 同じタンパク質濃度, 同じ組成の溶液中で野生型 PfuPCNA と変異型 PfuPCNA を比較すると, 前述のように野生型 PfuPCNA に比べて変異型 PfuPCNA (D143A, D143R, D143A/D147A) の溶出位置はより低分子量側にシフトしたので (図 4a), これらの変異型 PfuPCNA は明らかに野生型に比べて正しい環状構造を形成し難くなっていると言える.

さらに, PfuPCNA の三量体環状構造の安定性に寄与するものとして DNA の存在がある. PCNA 環の内部の DNA と相互作用する境界面については未だ情報が得られていないが, 最近, 大腸菌由来 β -クランプと DNA 複合体の結晶構造の解析より β -クランプ環の内側が DNA と相互作用している様式が判明した²¹⁾. PCNA 環の内部でも塩基性残基がイオンネットワークを形成して DNA と相互作用してい

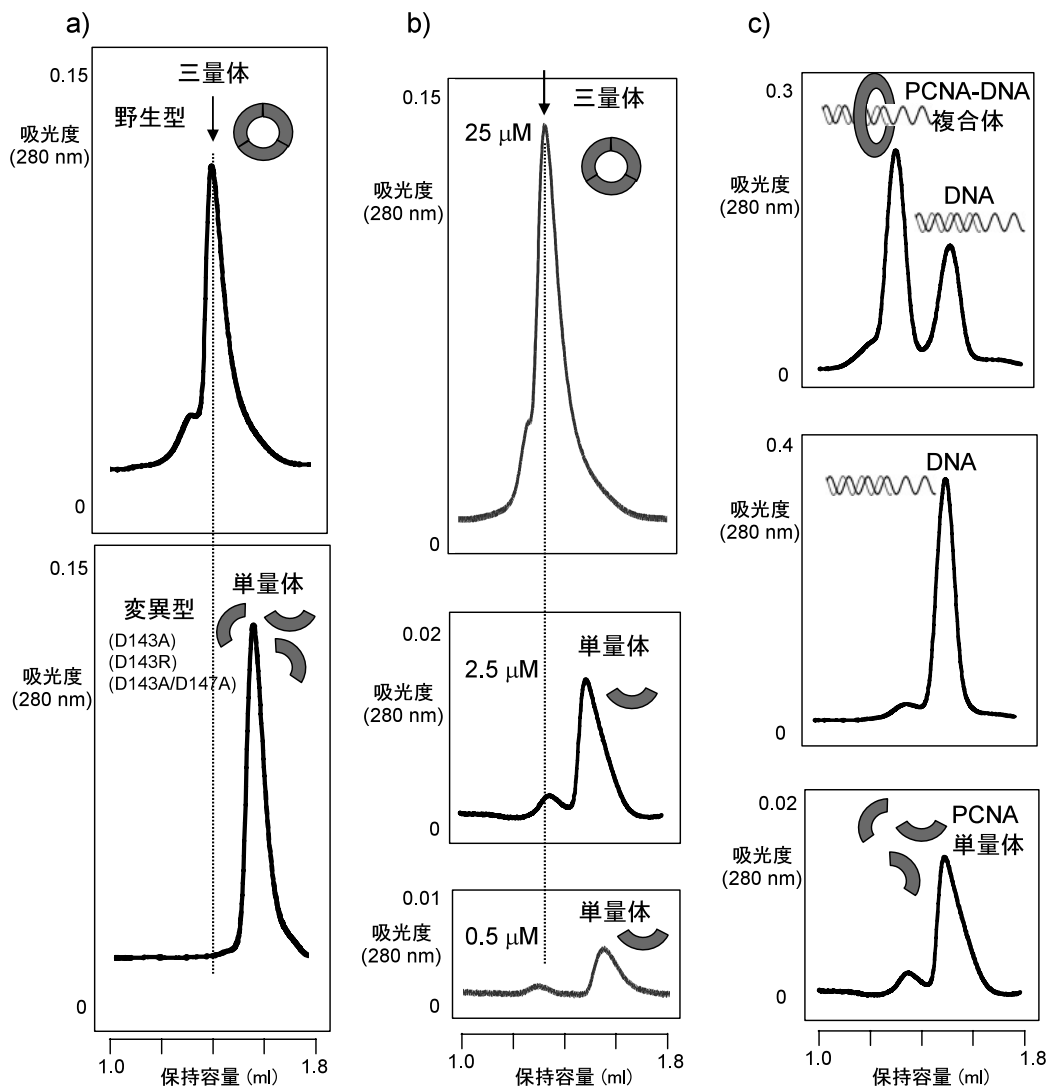


図4 ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた PfuPCNA の会合状態の分析

ゲルろ過カラムは Superdex 200 PC 3.2/30 (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いた。溶出溶液の組成は 50mM トリス緩衝液 (pH8.0), 10% グリセリンに 150mM 塩化ナトリウム (a) または 50mM 塩化ナトリウム (b, c) を含む。

a) 野生型 PfuPCNA (上段) と変異型 PfuPCNA (下段) をそれぞれ 25μM で用いた。b) 野生型 PfuPCNA について濃度をそれぞれ 25μM (上段) 2.5μM (中段) 0.5μM (下段) で用いた。c) 2.5μM 野生型 PfuPCNA と 3μM DNA の混合試料 (上段), 3μM DNA (中段), 2.5μM 野生型 PfuPCNA (下段)。

ると予想される。実際に、PfuPCNA 単独では三量体形成ができない濃度においても短い二本鎖 DNA (19 塩基 + 32 塩基) を環の内部に存在させることで、安定な三量体が形成できることを示すゲルろ過クロマトグラフィーの結果が得られた (図 4c)。

PCNA 三量体環状構造の安定に寄与すると考えられる因子にはさらに、PCNA と相互作用するタンパク質の結合によるものがある。前述した PIP ボックス配列を有するタンパク質が結合したときの PCNA 環の構造変化を、PfuPCNA を例にとって考察する。11 残基から成る PfuRFC 由来 PIP ボックスペプチドが結合した PfuPCNA の結晶構造

を、ヒト p21^{CIP1/WAF1} の PIP ボックスを含むペプチドがヒト PCNA と結合した状態の構造²¹⁾、およびバクテリオファージ RB69 の DNA ポリメラーゼ (gp43) の PIP ボックスを含むペプチドがファージ gp45 と結合した状態の構造²²⁾と比較すると、その結合様式がよく類似しており、PIP ボックスを介した分子間相互作用が各生物界を通じて保存されていることがわかる⁶⁾。次に PfuPCNA 単独の結晶構造と PIP ボックスペプチド-PfuPCNA 複合体の結晶構造を重ね合わせて比較すると、PIP ボックスペプチドが結合することによって、PfuPCNA 分子の C 末端側ドメインが PIP ボックスペプチドに押し下げられる形で環の内側に向かっ

て移動するという構造変化を起こしていることがわかった。この結果、分子間の逆並行 β シートにおける水素結合 ($N-O$ distance $< 3.3 \text{ \AA}$) の数が 4 組から 7 組に増加し、酵母の PCNA の 7 組、およびヒト PCNA の 8 組に匹敵する値にまでなることが判明した。また、前述のサブユニット境界面のイオン対ネットワークについては、PIP ボックスペプチドとの複合体形成による構造変化に伴い結合の組換えが観察され、イオン対ネットワーク形成に関わるアミノ酸の数が 5 個から 6 個に増えた⁶⁾。これらの知見は、PIP ボックスを有するタンパク質が結合することで PfuPCNA の三量体環状構造がより安定化することを示唆している。このようなより安定な複合体が DNA 鎖上で形成されることは、PCNA がクランプとしてそれぞれの結合タンパク質を安定に DNA 鎖上に維持するために妥当な構造変化であると考えられる。

4. PCNA 環状構造の安定性と DNA 鎖合成促進活性

前述のような物理化学的性質 (図 5) をもった PfuPCNA は、構造上類似した真核生物の PCNA と比較して三量体環状構造の安定性が低く、また変異の導入や溶液のイオン強度により三量体形成を制御できることがわかった。そこで次に、PfuPCNA の環状構造の安定性が DNA ポリメラーゼ活性にどのような影響を及ぼすかについてさらに詳しく調べるために、環状構造の安定性が異なる 4 種類の Pfu-PCNA (野生型, 変異型 (D143A, D143A/D147A, D143R)) を用いて、反応溶液中のイオン強度を変えながら、*in vitro* で DNA ポリメラーゼ (PfuPolB) による DNA 鎖合成の促進作用を比較した。高次構造形成により特定の部位で停止する傾向のある鋳型 DNA を用いて、PCNA による DNA 鎖合成促進活性を調べてみたところ、0~80mM 塩化ナトリウムの範囲では環状構造の安定性が低い変異型 Pfu-PCNA (D143A/D147A や D143R) がより強い促進活性を示し、さらに塩濃度を上げていくと、環状構造が不安定な

順に、促進活性も下がってくるということがわかった (投稿準備中)。この結果は、前述の筆者らの考察を支持するものであった。そこで、筆者らは変異型 PfuPCNA が PCR に利用できるのではないかと考え、野生型 PfuPCNA とともに環状構造の安定性の程度が異なる 3 種の変異型 PfuPCNA を用いて PCR を実施してみることにした。

5. PCNA による PCR 促進効果

PCNA が DNA ポリメラーゼによる DNA 鎖伸長反応を促進するクランプ分子であるなら、超好熱菌由来の耐熱性 PCNA を利用した PCR というものを誰もが考えつくであろう。しかしながら、実際に PCR 反応溶液に PCNA を加えてみても DNA 断片の増幅効率率は上がり、むしろ DNA ポリメラーゼだけで反応させた時に比べて阻害が生じる。その原因はおそらく DNA 鎖が合成された後も PCNA が DNA 鎖上に留まり、その結果次のサイクルに進むための二本鎖解離が阻害されるためではないかと考えられる (図 6a)。実際、PfuPolB による PCR が PfuPCNA によって阻害される場所に PfuRFC を加えると、促進効果が見られる (投稿準備中)。一般に、クランプローダーはクランプアンローダーとしても働くことがわかっている²³⁾。PfuRFC のクランプアンローディング活性によって、PfuPCNA が素早く DNA 鎖から離れ、二本鎖変性の後に再びローディングされて、次のサイクルの DNA 鎖伸長反応が促進されることが考えられる。従って、PCNA を PCR にうまく利用するためには、セルフローディング/アンローディングが素早く起こるような環状構造の安定性を有する PCNA の変異体を利用すればいいのではないかと筆者らは考えた。すなわち環状構造をより不安定化させた変異型 PfuPCNA の中には、それ自身で DNA への解離と再結合を繰り返すことができる適度な安定性を有するものがあるのではないかと考え、実験してみた。

入ファージ DNA を鋳型に用いて、6kb, 8kb, 15kb の長

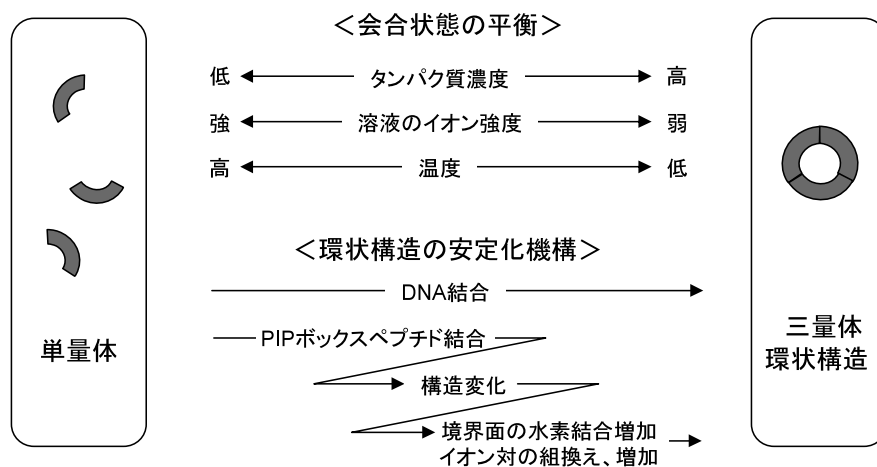


図 5 PfuPCNA 三量体環状構造の安定に関わる因子

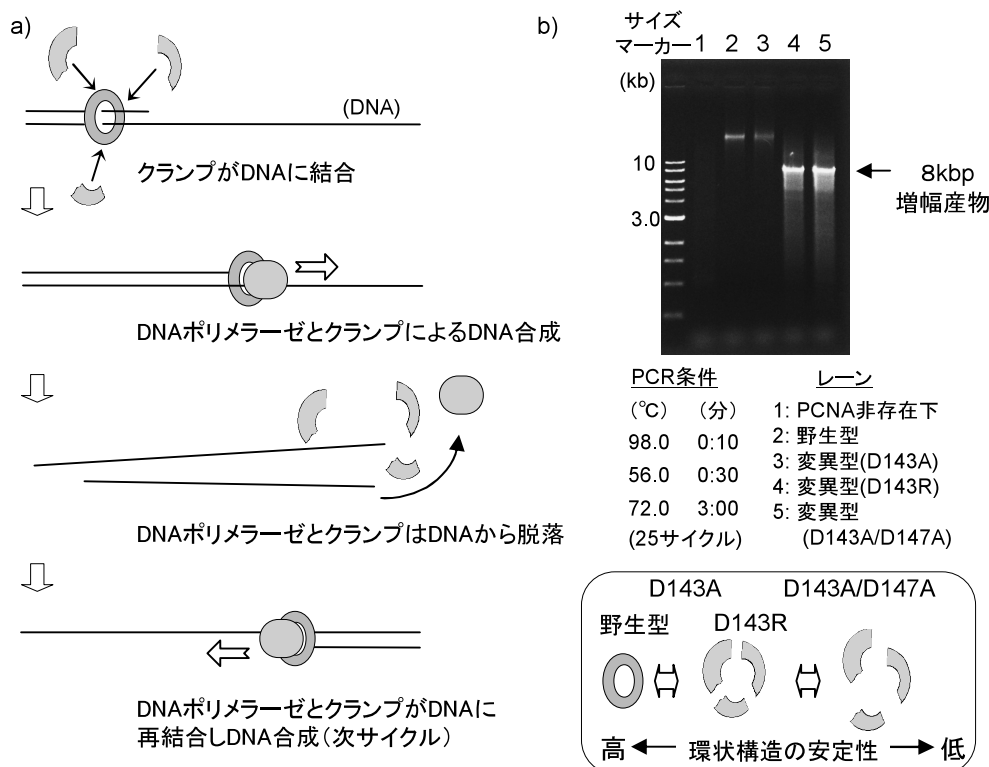


図6 変異型クランプのPCRへの応用

a) 環状構造の不安定なクランプをPCRに利用したときのクランプ分子の挙動モデル。

b) PfuPCNAを利用したPCRの結果(アガロースゲル電気泳動, 上段)と, 用いたPfuPCNAの環状構造の安定性を比較した模式図(下段)。

さのDNA領域を増幅させるPCRをモデルとして, Pfu-PCNAを加えない時には全く増幅産物が検出されない条件下でPfuPCNAの促進効果を見た。PfuPCNAは前述のDNA鎖伸長活性を比較した時と同様に, 野生型PfuPCNAと3種類の変異型PfuPCNAを用いて比較した。その結果は, 低塩濃度におけるDNA鎖伸長活性測定の時と同様に, 環状構造が不安定化した変異型PfuPCNA(D143A/D147A, D143R)を用いた時に, 顕著に目的の増幅産物が検出された。図6bに8kbのDNA領域を増幅したPCRの結果を示す。この結果は, PCNAが実用的にPCRに利用できることを示した初めての例である。

6. おわりに

本稿では超好熱性アーキア由来のPfuPCNAの環状構造形成に関わる構造上の特徴について紹介した。大腸菌の β -クランプやヒトのPCNAの環状構造の安定性については詳細に研究されており, これらの構造が極めて安定であることが報告されている²³⁾。サブユニット間の相互作用を示す K_d 値がそれぞれ60pM未満, 21nMであり, DNA鎖上への乗り降りにはクランプローダー/アンローダーが必須であるとされている。これらと比較してもPfuPCNAの環状構造は極めて解離し易い。また, 同じPCNAでも真核

生物の分子ではサブユニット間の境界面でイオン対形成がほとんどなく, 環状構造形成のための要素がPfuPCNAとは異なっている²⁴⁾。さらにまた, アーキアの中でも, サブユニット間の境界面でイオン対形成がほとんどなく, 異なった環状構造安定化様式を有する報告も出て来ている²⁵⁾。本稿では, PfuPCNAの特徴に基づいて環状構造の安定性を制御することで, このクランプ分子を利用した優れたPCR反応系の確立が可能であることを紹介した。PCRに利用するためには, まずタンパク質そのものが耐熱性であることが必須条件であり, 超好熱性アーキア由来のPCNAはその条件を満たす。さらにPfuPCNAのサブユニット間に形成されるイオン対ネットワークが, 環状構造の安定性に大きく寄与しているという特徴から, イオン対形成に関わるアミノ酸残基の変異体作製と, 反応液中のイオン強度とで, PCNAの環状構造の安定性を制御できるということを見出した。これによって, それまで困難であったPCNAのPCRへの応用が実現した。本稿でPCRへの応用について, 詳細な条件検討を含めた実験結果を示すことは, 本特集の目的から外れるので記載しないが, 筆者らはすでにPfuPCNAを利用したPCRにおいて, 伸長反応時間を短縮したより速いPCR, また同じ反応時間では, より産物量が多い高効率PCRの実施例を多数得ている。また

同一条件では、再現性よく結果が得られているために、実用的な PCR 補助因子として変異型 PfuPCNA が利用可能であることを見出している。

PCNA は細胞内 DNA トランスアクションにとって、極めて重要なタンパク質であるので、継続的に多くの関連研究が発表されている。本稿で示した超好熱性アーキアの PCNA の構造について、今後も多く他のクランプ分子と比較しながら、その特徴を生かした優れた機能性分子の創製を目指して研究を続けたいと考えている。

謝辞

PfuPCNA の結晶構造解析は、生物分子工学研究所 (BERI) において、森川耿右構造解析研究部門長、松宮茂樹博士とともに始めたものであり、継続的な共同研究に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., & Erlich, H.A. (1988) *Science*, **239**, 487–491.
- 2) Indiani, C. & O'Donnell, M. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **7**, 751–761.
- 3) Cann, I., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K., & Ishino, Y. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 6591–6599.
- 4) Matsumiya, S., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2001) *Protein Sci.*, **10**, 17–23.
- 5) Cann, I., Ishino, S., Yuasa, M., Daiyasu, H., Toh, H., Morikawa, K., & Ishino, Y. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 2614–2623.
- 6) Ishino, Y., Tsurimoto, T., Ishino, S., & Cann, I. (2001) *Genes Cells*, **6**, 699–706.
- 7) Matsumiya, S., Ishino, S., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2002) *Genes Cells*, **7**, 911–922.
- 8) Matsumiya, S., Ishino, S., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2003) *Prot. Sci.*, **12**, 823–831.
- 9) Ishino, S., Oyama, T., Yuasa, M., Morikawa, K., & Ishino, Y. (2003) *Extremophiles*, **7**, 169–175.
- 10) Miyata, T., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, S., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **7**, 11632–11636.
- 11) Nishida, H., Ishino, S., Miyata, T., Morikawa, K., & Ishino, Y. (2005) *Genes Genet. Syst.*, **80**, 83–93.
- 12) Miyata, T., Suzuki, H., Oyama, T., Mayanagi, K., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13795–13800.
- 13) Nishida, H., Matsumiya, S., Tsuchiya, D., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2006) *Acta Cryst.*, **F62**, 253–256.
- 14) Ishino, Y. & Ishino, S. (2001) *Meth. Enzymol.*, **334**, 249–260.
- 15) Ishino, S. & Ishino, Y. (2006) *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **25**, 681–691.
- 16) Tori, K., Kimizu, M., Ishino, S., & Ishino, Y. (2007) *J. Bacteriol.*, **189**, 5652–5657.
- 17) Moldovan, G.L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007) *Cell*, **129**, 665–679.
- 18) Mayanagi, K., Kiyonari, S., Saito, M., Shirai, T., Ishino, Y., & Morikawa, K. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4647–4652.
- 19) Kiyonari, S., Tahara, S., Shirai, T., Iwai, S., Ishino, S., & Ishino, Y. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6439–6453.
- 20) Chapados, B.R., Hosfield, D.J., Han, S., Qiu, J., Yelent, B., Shen, B., & Tainer, J.A. (2004) *Cell*, **116**, 39–50.
- 21) Gulbis, J.K., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. & Kuriyan, J. (1996) *Cell*, **87**, 297–306.
- 22) Shamoo, Y. & Steitz, T.A. (1999) *Cell*, **99**, 155–166.
- 23) Yao, N., Turner, J., Kelman, Z., Stukenberg, T., Dean F., Shechter, D., Pan, Z.-Q., Hurwitz, J., & O'Donnell, M. (1996) *Genes Cells*, **1**, 101–113.
- 24) Ionescu, C.N., Shea, K.A., Mehra, R., Prundeanu, L., & McAlear, M.A. (2002) *Biochemistry*, **41**, 12975–12985.
- 25) Winter, J.A., Christofi, P., Morroll, S., & Bunting, K.A. (2009) *BMC Struct. Biol.*, **9**, 55.