The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural and biochemical studies of two novel metagenome-derived RNases H1
Author(s)	Nguyen, Tri-Nhan
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/26193
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Synopsis of Thesis

Title: Structural and biochemical studies of two novel metagenome-derived RNases H1
(メタゲノム法により単離した２種類の新規リボヌクレアーゼH1の構造学的、生化学的研究)

Name of Applicant: Nguyen, Tri-Nhan

Twelve new type 1 RNase H genes were identified from the compost metagenomic library. The gene products from two of them, LC9-RNase H1 and LC11-RNase H1, were overproduced in *E. coli*, purified and characterized. The crystal structure of LC9-RNase H1 was determined. Based on the structure-based mutational analyses, we identified four active site residues, including non-conserved glutamate and asparagine residues. We propose that LC9-RNase H1 represents bacterial RNases H1 with an atypical DEDN active site motif, which are evolutionarily distinct from those with a typical DEDD active site motif. LC11-RNase H1 is a *Sulfolobus tokodaii* RNase H1 (Sto-RNase H1) homolog. The crystal structure of LC11-RNase H1 was determined both in substrate-free and substrate-bound forms. The structure of LC11-RNase H1 is highly similar to that of Sto-RNase H1, except that it lacks a C-terminal tail, which is responsible for hyperstabilization of Sto-RNase H1. LC11-RNase H1 is less stable than Sto-RNase H1 by 37°C, mainly because of the absence of this C-terminal tail. LC11-RNase H1 does not cleave double-stranded RNA (dsRNA) unlike Sto-RNase H1, probably because dsRNA does not fit into two grooves on the protein surface of LC11-RNase H1. LC11-RNase H1 interacts with four non-consecutive 2'-OH groups of the RNA strand. We showed that these interactions are required for efficient cleavage of the substrate by the enzyme.

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	(Nguyen, Tri-Nhan)		
論文審査担当者		(職)	氏　名
	主 査	教 授	金谷　茂則
	副 査	教 授	原島　俊
	副 査	教 授	大竹　久夫
	副 査	教 授	福井　希一
	副 査	教 授	福崎　英一郎
	副 査	教 授	村中　俊哉
	副 査	教 授	紀ノ岡　正博
	副 査	教 授	渡邉　肇
	副 査	教 授	仁平　卓也
	副 査	教 授	藤山　和仁
	副 査	教 授	永井　健治

論文審査の結果の要旨

本論文は、メタゲノム法により単離した２種類の新規リボヌクレアーゼ H1（RNase H1）の構造および生化学的諸特性について研究したものであり、以下に示すように、序論、本論４章、および総括から構成されている。第１章（序論）では、RNase H の分類、生理機能、構造、触媒機構、基質認識機構などに関するこれまでの研究をまとめるとともに、本研究の目的と意義を述べている。第２章では、万博コンポストからメタゲノム法により RNase H 遺伝子をスクリーニングすることにより、多くの新規 RNase H1 遺伝子をクローニングできること、その中には、典型的な DEDD（Asp-Glu-Asp-Asp）活性部位モチーフを含まない LC9-RNase H1 や、C 末端テールをもたない *Sulfolobus tokodaii* RNase H1 ホモログ（LC11-RNase H1）などの遺伝子も含まれることを明らかにしている。第３章では、LC11-RNase H1 の活性、安定性を解析すると共に、その結晶構造を決定することにより、LC11-RNase H1 の構造や RNA/DNA ハイブリッドに対する活性は、Sto-RNase H1 と良く似ていることを明らかにしている。また、C末端テールの欠損、分子内空孔の増加、分子内に埋もれた極性残基の増加などにより、LC11-RNase H1 は Sto-RNase H1 より 37℃も不安定であること、基質の RNA 鎖と DNA 鎖の結合に必要な LC11-RNase H1 の２つの溝がニ本鎖 RNA の結合には適していないため、LC11-RNase H1 は Sto-RNase H1 と異なりニ本鎖 RNA を加水分解できないことを明らかにしている。第４章では、LC11-RNase H1 と 14 bp RNA/DNA ハイブリッドの複合体の結晶構造を決定することにより、LC11-RNase H1 はヒト RNase H1 と異なり、RNA 鎖の 2'-OH 基と不連続な水素結合を形成すること、LC11-RNase H1 にはユニークなリン酸基結合部位が存在すること、を明らかにしている。また RNA を４，５，６残基含む DNA-RNA-DNA/DNA を基質として用いて活性を測定することにより、連続であれ不連続であれ、RNA 鎖の 2'-OH 基とタンパク質の間の水素結合が完全に形成された時に、酵素は基質を効率良く切断することを明らかにしている。第５章では、LC9-RNase H1 の結晶構造を決定することにより、他の RNase H1 には保存されていない Glu と Asn が活性部位を構成すること、LC9-RNase H1 を含め非典型的な DEDN 活性部位モチーフをもつ RNase H1 は、典型的な DEDD 活性部位をもつ RNase H1 とは進化的に大きく異なるグループに分類されること、を明らかにしている。第６章（総括）では、本研究で得られた結果に基づき RNase H の基質認識機構、基質特異性、分子進化、さらにはメタゲノム法の有用性について考察するとともに、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文はメタゲノム法により単離した２種類の新規 RNase H1（LC9-RNase H1、LC11-RNase H1）の構造および機能に関して構造生物学的な観点から新たな知見を見いだした点で意義深い。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。