OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造と機能
Author(s)	片柳, 克夫
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3088031
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	片柳克夫（かたやなぎかつお）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第10031号
学位授与年月日	平成4年2月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**大腸菌リボヌクレアーゼHの立体構造と機能**
論文審査委員	（主査）教授 冨田 研一 （副査）教授 今西 武 教授 岩田 宙造 教授 北川 勲

論文内容の要旨

リボヌクレアーゼH（RNase H）は，DNA／RNAハイブリッド2重鎖を特異的に認識し，そのRNA鎖のみを切断するエンドヌクレアーゼであり，その活性にはMg^{2+}を必須とする。この酵素は自然界に広く分布し，DNAの複製の開始に関与していると考えられている。さらに，レトロウイルス由来の逆転写酵素のC末端部分に，RNase Hドメインが存在することが明らかにされ，注目されている。

この論文は，大腸菌RNase Hの立体構造と機能との関係を論じたものである。この酵素の立体構造を，X線結晶構造解析により1.48Å分解能という高い精度で決定し，さらにその活性に必須なMg^{2+}結合部位を同定した。このMg^{2+}の周辺には4つの酸性アミノ酸残基が存在することを明らかにし，これらを活性部位と決定した。さらに，この活性部位のアミノ酸を置換した3つの変異体のX線構造解析を行い，構造と機能の関係について検討した。また基質であるDNA／RNAハイブリッド2重鎖と酵素との予想される結合様式についても検討した。

第1章では，大腸菌RNase HのX線結晶構造解析について述べ，この分子の構造上の特徴を明らかにした。究極的には，この酵素は5本のαヘリックスと1枚のβシート（5本のβ鎖からなる）から構成されるα＋β型構造に分類される。ディスタンスマップからは，2つのドメインに分けられ，このうち小さい方のドメイン（塩基性の突出部）はヘリックスαⅢとそれに続く長さが約10残基のループからなり，塩基性のアミノ酸残基が集中して存在する。さらにこのαⅢが他の2次構造に比べて温度因子が高いことと，それに続くループには左巻き型ヘリックスを取る残基が多いことから，この塩基性の突出部はゆらぎの大きいことが予想され，基質である核酸との結合に関与しているものと予想される。DNA結合タンパク質に多くみられるヘリックス・ターン・ヘリックス構造は存在しないこ

とが明らかになったが，転写調節蛋白質に見られるロイシン・ジッパー様の関係が，疎水結合コアにあるヘリックスαⅠとαⅣの間に見いだされた。立体構造は分子内水素結合によって安定化されると考えられるが，その中で特にアルギニン残基の寄与が目だった。

Mg^{2+}，Ca^{2+}，Ba^{2+}のアルカリ土類金属をそれぞれ浸漬した結晶をX線構造解析した結果，3つとも共通の位置に単一のピークが得られ，Mg^{2+}結合部位であることを疑いなく同定することができた。この周囲には，活性に関与する4つの酸性アミノ酸残基（Asp 10，Glu 48，Asp 70，Asp 134）が存在することを明らかにした。同時に，この研究とは独立に，これら4つともにレトロウイルス由来の逆転写酵素25種類にわたって完全に保存されていること（Doolittleら）が報告されたが，その生物学的意味が初めて明らかにされた。またX線解析と並行して行われた部位特異的変異法の実験（Kanayaら）からも，これらのうち前3者をアミノ酸置換した変異体が完全に失活する事が示され，これらの酸性残基が活性に関与していることが裏付けられた。

第2章では，活性アミノ酸残基Asp 10，Glu 48，Asp 70をそれぞれAsn，Gln，Asnに置換した変異体のX線結晶構造解析を行い，失活した状態での酵素の立体構造を明らかにし，構造と機能の関係について検討した。いずれも全体のフォールディングには大きな変化はなく，構造差は活性部位近辺の局所構造に限定されていた。この事実は，Mg^{2+}結合部位のわずかな変化で，活性が失われることを示している。たとえば，D10N変異体では，Asn10側鎖のアミド基とAsp 70側鎖のカルボキシル基との間に新たな水素結合が生じた。E48Q，D70Nでもそれぞれ新たに導入されたアミド基が，Asp 10側鎖のカルボキシル基との間に新たな水素結合が形成された。活性残基のカルボキシル基の電荷が消失することによって，側鎖が移動して新しい水素結合が形成されたものと考えられる。すなわち，酵素活性には，立体構造的にも近接した3つの酸性残基が共に負の電荷を持っていることが必要条件であると考えられる。また，His 124をアラニンに置換した変異体は比活性が2.5%まで落ちる。このHis124は長い柔軟なループ上に存在していることが決定された構造から解っているが，このループの構造は結晶形に依存して変化することが，D70Nの解析から示された。この事実は，His 124が間接的に活性に関与していることを示唆している。

第3章では，得られたRNase Hの立体構造を様々の観点から考察し，酵素と核酸の結合様式とを明らかにした。RNase H分子の静電ポテンシャルを計算して表示すると第1章で述べた塩基性の突出部が正の領域として，またMg^{2+}結合部位が負の領域として明瞭に現れた。この2つの領域を結ぶ線には基質のDNA／RNAハイブリッド2重鎖がうまくフィットする円筒状のくぼみがあり，基質の結合部位であると考えられた。この結合様式は，後にNMRを用いた核酸との結合実験（Odaら）からも裏付けられた。また，すでにDNA 2重鎖との複合体のX線解析の行われているDNase Ⅰと立体構造を比較した結果βシート・モチーフに類似性が認められ，これから類推されるRNase Hの場合の結合様式は，先ほどの円筒状のくぼみとうまく一致した。これらの事実から導かれる大腸菌RNase Hと基質であるDNA／RNAハイブリッド2重鎖との結合モデルを示した。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリット２本鎖を特異的に認識し，そのＲＮＡ鎖のみを切断する大腸菌リボヌクレアーゼＨの立体構造を１．４８Å分解能のＸ線結晶構造解析によって決定し，活性に必須なMg^{2+}イオンおよびその周辺にある活性アミノ酸残基の結合部位を明らかにした。またこれら活性アミノ酸を置換した変換体のＸ線構造解析からＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド２本鎖と酵素との結合様式について考察した。

以上の成果は，博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認める。