The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of four acidic amino acids that constitute the catalytic center of the RuvC Holliday junction resolvase
Author(s)	斉藤, 敦
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39622
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 65 】

氏　　名	斉藤　敦（さいとう　あつし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　12173　号
学位授与年月日	平成7年12月6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	Identification of four acidic amino acids that constitute the catalytic center of the RuvC Holliday junction resolvase (Holliday 構造特異的エンドヌクレアーゼRuvCの活性中心を形成する4個の酸性アミノ酸の同定)
論文審査委員	(主査) 教授　品川日出夫 (副査) 教授　島田　和典　　教授　杉野　明雄

論文内容の要旨

【目　的】

DNA 相同組換えのメカニズムは大腸菌において最も詳細に解析されている。大腸菌のRuvCタンパクは，相同組換えの後期過程においてHolliday構造と呼ばれる組換え中間体にニックを入れて解離させ，中間体を最終産物である組換え体DNA に移行させるエンドヌクレアーゼである。RuvCは19 kDa サブユニットのホモ2量体を形成し，エンドヌクレアーゼ活性にはMg^{2+}のような2価の金属イオンを必要とする。大腸菌の DNA polymeraseI や RNaseHl などのMg^{2+}依存性ヌクレアーゼでは，結晶構造解析および変異体の解析により，3個または4個の酸性アミノ酸がヌクレアーゼの活性中心を形成していることが明らかになっている。これらの知見をふまえ，本研究ではRuvC エンドヌクレアーゼの活性中心を形成する酸性アミノ酸を同定することを試みた。RuvC エンドヌクレアーゼの作用機序を明らかにする試みは，相同組換えの後期過程のメカニズムを解明する上で重要な意義があると考える。

【方法ならびに成績】

RuvC（172アミノ酸）には7個のAsp と6個のGlu，合計13個の酸性アミノ酸がある。ヌクレアーゼ活性に関与する酸性アミノ酸を同定するため，何れかのAsp（D）を，Asn（N）またはGlu（E）に置換するような*ruvC*遺伝子の変異体，および何れかのGlu（E）を，Gln（Q）またはAsp（D）に置換する変異体を作成した。変異遺伝子を持つプラスミドを*ruvC*株に導入したところ，Asp7 変異体（D7N, D7E），Glu66変異体（E66Q, E66D），Asp138 変異体（D138N, D138E），Asp141 変異体（D141N, D141E）は*ruvC*株の表現型（紫外線感受性）を相補しなかった。また*ruvC*$^{+}$ 株に導入すると，これらの変異体は dominant negative 表現型を示した。次に*in vitro*で変異体の機能を解析するため，これら8種のRuvC変異タンパクを多量に産生させ高度に精製した。合成Holliday構造を用いて，Holliday構造特異的DNA 鎖切断能を調べたところ，全ての変異体において著しく低下していた。その一方で何れの変異体とも，野性型と同等のHolliday構造特異的結合能を保持していた。また何れの変異体も，野性型同様に安定な2量体を形成していた。以上の結果よりAsp7, Glu66, Asp138, Asp141 はDNA 鎖切断反応のみに関与しており，Holliday交叉

点への結合や2量体形成には関与していないことが分かった。RuvCがエンドヌクレアーゼとして機能するには，活性中心と金属イオンの相互作用が必須と考えられる。Asp7, Glu66, Asp138, Asp141変異体では，この相互作用に直接または間接的に関与する酸性アミノ酸が変異したことにより，相互作用に支障をきたし，その結果DNA鎖切断能が著しく低下した可能性が考えられる。高濃度のMg^{2+}存在下ではGlu66変異体（E66Q）の残存活性がある程度回復した。また高濃度のMn^{2+}存在下ではAsp138 変異体（D138N, D138E）およびAsp141 変異体（D141N）の残存活性がある程度回復した。Asp7 変異体に関しては，高濃度のMg^{2+}またはMn^{2+}存在下ともに残存活性の回復は認められなかった。Asp7 が金属イオンとの相互作用に最も重要であり，直接関与している可能性が高いと考えられる。

【総　括】

RuvCのX線結晶解析によりAsp7, Glu66, Asp138, Asp141が三次構造上DNA 結合部位と考えられる溝の底部で近接して存在すること，そして溝の内壁には数個の塩基性アミノ酸が配位していることが明らかにされている。更に2分子のRuvCがそれぞれ，上記4個の酸性アミノ酸を含まないαヘリックスを介してかなり安定な2量体を形成していることも示唆された。また結晶構造中でMn^{2+}が，4個の近接する酸性アミノ酸のうちAsp7 に最も近い位置に配位していることも分かっている。本研究では，4個の酸性アミノ酸がDNA 鎖切断反応に必須であることが明らかになった。またこれらが Holliday 交叉点への結合や2量体形成には関与していないこと，金属イオンとの相互作用におけるAsp7 の直接の関与も示唆された。本研究で得られた結果は結晶解析の結果とよく一致している。Asp7, Glu66, Asp138, Asp141 はRuvCエンドヌクレアーゼの活性中心を形成しており，金属イオンと相互作用することによりエンドヌクレアーゼとして機能することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

DNA 相同組換えの過程では，2つのDNA 分子は相同な単鎖を交換することにより，Holliday構造と呼ばれる普遍的中間体を形成する。大腸菌のRuvCタンパクはHolliday構造を特異的に切断するエンドヌクレアーゼであり，組換え体DNA の形成に重要な酵素である。本研究では，大腸菌の RuvCエンドヌクレアーゼの活性中心の構造を明らかにするため，存在する13個の酸性アミノ酸の何れかを類似アミノ酸に置換するような *ruvC* 遺伝子の変異体を作成し，相補性試験でその表現型を調べた結果，4個の酸性アミノ酸が活性に重要であることが示唆された。これらの RuvC変異タンパクを高度に精製してin vitroで Holliday構造特異的DNA 鎖切断能，Holliday構造特異的結合能，2量体形成能を調べた。4個の酸性アミノ酸（Asp7, Glu66, Asp138, Asp141）がDNA 鎖切断反応に必須であること，これらが Holliday交叉点への結合や2量体形成には関与していないことを明らかにした。これらの結果より上記4個の酸性アミノ酸が RuvCエンドヌクレアーゼの活性中心を形成していると結論した。

本研究は，Holliday構造を認識して解離させる RuvCの反応機構を分子レベルで解明する上で重要な手掛かりを与えるものであり，学位の授与に値するものと認める。