



Title	Role of Walker Motif A of RuvB Protein in Promoting Branch Migration of Holliday Junctions
Author(s)	菱田, 卓
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41739
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

氏 名	菱 田 卓
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 15223 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年3月24日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Role of Walker Motif A of RuvB Protein in Promoting Branch Migration of Holliday Junctions (Holliday構造の分岐点移動反応の分子機構－RuvBモーター蛋白質上のWalker Aモチーフの役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 品川日出夫
	(副査) 教授 杉野 明雄 教授 堀井 俊宏

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

相同的DNA組換えは、種の遺伝的多様性をもたらす原動力として働くだけでなく、DNAの種々の障害を克服するための主要なDNA修復経路の1つである。最近、組換えに関連する遺伝子の欠損が、重篤な遺伝病の原因となっていることが判明し、医学的にも重要な問題となってきている。

相同組換えの反応過程において、二分子の相同的DNAが相補鎖を交換して生じた Holliday構造は、種をこえて普遍的に形成される重要な組換え中間体として提唱されている。大腸菌において、RuvA、RuvB、RuvC蛋白質は、RecA蛋白質などの働きによって作られる Holliday構造のプロセッシングに関与していることが知られている。RuvB蛋白質は、ホモ6量体リング構造を活性型とし、RuvA蛋白質と複合体を形成して、ATP加水分解反応に依存してDNA分岐点移動反応を促進するモーター蛋白質である。本研究では、ATPの結合及び加水分解に関与すると予想される Walker A モチーフの変異体を作成し、RuvBによる Holliday構造の分岐点移動反応のメカニズムについて解析を行った。

【方法ならびに成績】

ATPの結合／分解に関与していると予想される Walker A モチーフ (GxxGxGKT) のリジン残基及びスレオニンを、各々をアラニン又は、アルギニン、及びアラニン又はセリンに置換した4つの *ruvB* 変異体 (K68R、K68A、T69S、T69A) を作製した。

1) Walker A 変異体のDNA修復能

4種の *ruvB* 変異遺伝子をプラスミド上に各々クローニングし、*ruvB*破壊株の紫外線高感受性の相補性テストを行った。その結果、T69Sは野生型と同等の修復活性を示した。K68R、K68A、T69Aは、いずれも相補しなかったが、野生株に導入した場合、野生株を紫外線高感受性にする、いわゆるドミナントネガティブの表現型を示した。このドミナントネガティブ効果は、K68A、T69Aの方がK68Rより強かった。

2) Walker A 変異蛋白質のATP結合／分解活性及び分岐点移動反応活性

精製したK68R、K68A、T69A蛋白質のATPase活性を測定した結果、いずれの蛋白質もほとんどATPを加水分解出来なかった。一方、ATP結合能に関しては、K68RはK68A、T69Aに比べてATP結合能の低下が大きかった (Kd値で野生型の70倍)。合成DNAで作成した Holliday構造を基質とした RuvA-RuvB複合体 (RuvAB) による

分岐点移動反応の解析では、K68R、K68A、T69A による分岐点移動反応は観察されなかった。

3) オリゴマー形成能

ゲルろ過クロマトグラフィーによってオリゴマー形成能を解析した。その結果、ATP と Mg^{2+} 存在下において K68A と T69A は野生型 RuvB と同様に活性型 6 量体を形成していたが、K68R は不活性型である 12 量体を形成していた。野生型 RuvB とのヘテロオリゴマーを形成できるかどうかを、変異 RuvB 蛋白質と GST-RuvB 融合蛋白質を用いた pull-down 実験で調べたところ、いずれも野生型 RuvB とヘテロオリゴマーを形成できることがわかった。

4) DNA 結合能

変異 RuvB 蛋白質の DNA 結合能をゲルシフト実験によって調べた。その結果、ATP γ S と Mg^{2+} 存在下において、野生型 RuvB は二重鎖 DNA と結合したが、変異 RuvB はいずれも DNA と結合しなかった。これまでの研究から、RuvA は、RuvB の DNA 結合を促進することが示されており、RuvA、ATP γ S、 Mg^{2+} の存在下において DNA 結合能を調べたところ、K68A と T69A は DNA と結合したが、K68R は出来なかった。ゲルろ過クロマトグラフィーによる結果、これら 3 つのミュータント蛋白質は、いずれも RuvA と複合体を形成できることから、K68R の DNA 結合能の欠損は、ATP γ S による DNA 結合に必要なコンフォメーションの変化を起こせない為であると考えられる。

5) in vitro における変異 RuvB 蛋白質による分岐点移動反応の阻害

K68R、K68A、T69A はいずれも野生型 RuvAB による合成 Holliday 構造の分岐点移動反応を阻害した。この反応時の ATP 加水分解反応を調べたところ、野生型 RuvB の ATP 加水分解活性は阻害されなかった。これらの結果は、Holliday 構造上で、RuvA と複合体を形成した野生型とミュータントのヘテロ 6 量体は ATP 加水分解活性を触媒出来るが、分岐点移動反応は出来ないと考えられる。

次に、RecA による相同 DNA 間の組換え反応に RuvAB を加え、組換え中期から後期反応の *in vitro* 再構成系を構築した。この反応系では、野生型 RuvAB の付加によって組換え中間体の分岐点移動反応による解離が促進された。この再構成系に K68R、K68A、T69A を各々加えたところ、組換え中間体が蓄積し、組換え体の生成が見られないか、非常に遅れて生成され、組換え反応の阻害が観察された。また K68R による阻害効果は、K68A、T69A による効果に比べて弱かった。この結果は、*in vivo* で K68R のドミナントネガティブの効果が、K68A、T69A による効果よりも弱いことと一致する。

【総括】

Walker A モチーフのリジン、スレオニン残基が ATP の加水分解及び結合に直接的に関係していることが示された。また、Walker A モチーフの変異の違いによって ATP の結合能に差が見られた。この ATP の加水分解または結合と加水分解の両方に欠損を持つ変異蛋白質の解析から、ATP 結合は RuvB の DNA 結合及び活性型 6 量体形成に必要なコンフォメーションの変化に重要であること、RuvB の 6 量体の各々のサブユニットが連続的に ATP を加水分解することが分岐点移動反応に重要であることが示唆された。さらに、これらの変異蛋白質によるドミナントネガティブの効果を *in vitro* で再構成し、野生型 RuvB の活性阻害によって組換え中間体の蓄積が生じることを明らかにした。

以上の結果から、分岐点移動反応のメカニズムとして、RecA の鎖交換反応によって形成された組換え中間体上に、RuvA によって呼び込まれた RuvB は、活性型 6 量体の全てのサブユニットが協調し合いながら連続的に ATP 結合／加水分解のサイクルを繰り返し行い、この反応と共に一連のコンフォメーションの変化が分岐点移動反応を起こしていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

DNA の相同組換えと組換え修復において、2 つの DNA 分子が相同的な单鎖を交換することにより、Holliday 構造と呼ばれる組換え中間体が形成される。これまでの研究から、大腸菌において、RuvA、RuvB、タンパク質は複合体を形成し、Holliday 構造に特異的に作用して、組換え中間体の分岐点移動反応を行っていることが示されている。

本研究においては、分岐点移動反応においてモータータンパク質の役割を果たしている RuvB タンパク質の ATP

結合や加水分解活性に影響を与える変異タンパク質を作製し、分子レベルでの解析を行った。その結果、RuvBのDNA結合や活性型6量体形成に必要な構造変化には、ATPによるアロステリック作用が重要であることを示した。また、野生型と変異RuvBタンパク質のヘテロ6量体を用いて、ATP加水分解反応と分岐点移動反応の共役の分子メカニズムに関して詳細な解析を行い、新しい知見を見い出した。

これらの成果は、相同組換えにおける Holliday構造の分岐点移動反応の反応機構の理解に大きく貢献したものであり、博士（医学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。