



Title	超好熱古細菌のインテインがコードするホーミング・エンドヌクレアーゼPI-Pfulの結晶構造
Author(s)	一柳, 健司
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41921
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	いちやなぎけんじ 一柳 健 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 1 8 8 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 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	超好熱古細菌のインティンがコードするホーミング・エンドヌクレアーゼ PI-PfuI の結晶構造
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 後藤 祐児 (副査) 教 授 福山 恵一 生物分子工学研究所 森川 耿右

論 文 内 容 の 要 旨

超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* がコードするインティン PI-PfuI は、プロテイン・スプライシングと部位特異的エンドヌクレアーゼという二つの活性を有する蛋白質で、リボヌクレオチド還元酵素の一部として合成された後、連続した四つの化学反応により、自己触媒的に前駆体蛋白質から切除されて生成する。この酵素は「ホーミング・エンドヌクレアーゼ」とよばれる酵素の一種で、インティン遺伝子の入っていない相同遺伝子座 (Int⁻) の DNA を特異的に切断する。この切断は、Int⁻ 座にインティン遺伝子を挿入する「インティン・ホーミング」と呼ばれる現象の引き金となる。PI-PfuI の立体構造と機能の相関関係を研究するため、この蛋白質の結晶構造を 2.1 Å 分解能で決定した。

PI-PfuI の結晶構造は、①プロテイン・スプライシングの活性を持つ Hint ドメイン②DNA の結合と切断を行うエンドヌクレアーゼ・ドメインと③新規な構造を持つ Stirrup ドメインから構築されていた。一次配列上、エンドヌクレアーゼ・ドメインと Stirrup ドメインは Hint ドメインの中に挿入されている。Hint ドメインは β シートでできた馬蹄形をしており、中心のくぼみに N 末端と C 末端が位置し、プロテイン・スプライシングの活性中心を構成していた。エンドヌクレアーゼ・ドメインは疑似二回軸によって関係づけられるサブドメイン構造をしており、それぞれのサブドメイン由来の二枚の β シートは馬鞍形の DNA 結合面を形成していた。非常によく保存された LAGLIDADG 配列は二回軸の近傍で α ヘリックスを形成して、サブドメイン・インターフェースとなると同時に、その C 末端はエンドヌクレアーゼ活性中心を構成していた。LAGLIDADG 配列をもつホーミング・エンドヌクレアーゼ PI-PfuI、PI-SceI、I-CreI、I-DmoI のエンドヌクレアーゼ部分は同じ基本フォールドを持っているが、 β シート領域は変化に富んでおり、各々が異なった DNA 配列と結合することと対応している。

DNase I フットプリント法により、PI-PfuI が基質 DNA の 30 塩基対以上の領域と特異的に結合することを明らかにし、酵素表面の静電ポテンシャル分布をもとに酵素-DNA 複合体のモデルを構築した。このモデルは、エンドヌクレアーゼ・ドメインは切断箇所近傍の 20 塩基対と結合することを示唆している。更に上流の 10 塩基対は Stirrup ドメインと結合していると考えられる。Stirrup ドメインは Hint ドメインとエンドヌクレアーゼ・ドメインの間に挿入されたドメインであり、インティンに特異的である。従って、このドメインはインティンに付加的な DNA 結合能を与えて、より配列特異的なエンドヌクレアーゼとして機能することを可能にしていると考えられる。

二重鎖切断反応において、本研究で PI-PfuI による切断は二本の鎖に対して等価でないことを明らかにした。そ

の機構は、立体構造の観点から説明できる。二つのエンドヌクレアーゼ・サブドメインは、それぞれ一つずつ活性中心を提供していて、おのおのが片側の DNA 鎖を切断すると考えられる。しかし、Asp149を含む活性中心には Lys 322および Asp173も関与しているが、Glu250を含む活性中心には対応する残基がなく、切断効率が悪いと考えられる。そのために非等価なニッキング反応が起こるのであろう。

論文審査の結果の要旨

Pyrococcus furiosus がコードする PI-*PfuI* は、プロテイン・スプライシングと部位特異的エンドヌクレアーゼという二つの活性を有する。本論文は、この蛋白質の結晶構造を決定し、PI-*PfuI* が、Hint ドメイン、エンドヌクレアーゼ・ドメインと Stirrup ドメインから構築されていることを明らかにした。更に、エンドヌクレアーゼ反応の分子機構を提案した。本論文は、PI-*PfuI* の構造と機能の相関解明に重要な知見を与えるものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものとして認める。