OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular mechanism of Holliday junction branch migration by the RuvA-RuvB protein complex : Characterization of novel RuvB mutant proteins(I148T and I150T) defective in the interaction with RuvA
Author(s)	韓, 龍雲
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42516
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	韓（はん）　龍雲（よんうん）
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記番号	第　15988　号
学位授与年月日	平成13年3月23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	Molecular mechanism of Holliday junction branch migration by the RuvA-RuvB protein complex : Characterization of novel RuvB mutant proteins (I148T and I150T) defective in the interaction with RuvA. (RuvA-RuvB蛋白質複合体によるHolliday junctionの移動の分子機構：RuvAとの相互作用に欠損のあるRuvB-I148T、RuvB-I150T変異体蛋白質の生化学的解析)
論文審査委員	(主査) 教授　品川日出夫 (副査) 国立遺伝学研究所教授　小川　智子　　教授　野島　博

論文内容の要旨

はじめに

大腸菌RuvA-RuvB蛋白質複合体は、相同組換えの中間体であるHolliday構造の分岐点移動（branch migration）を促進する。この反応において、RuvAがHolliday構造の認識とRuvBをHolliday構造に呼び込む活性を担っている。RuvBはモーター蛋白質としての活性を担い、その構造類似性からAAA$^+$ATPase superfamilyに属する。

これまでに私の研究室ではRuvBの構造と機能の相関を明らかにするために多数の*ruvB*変異体遺伝子を単離してきた。その中で、高発現により野生株の成長速度およびコロニー形成能を著しく減少させ、通常の発現量ではDNA修復欠損を示す二種類の変異体I148T 、I150T に注目し、本研究では、その変異体蛋白質の生化学的解析を行い、以下の知見を得た。

結果と考察

これら2つの変異体蛋白質はbranch migration活性に欠損が見られた。その原因を探るため、個々の機能について調べたところ、ATPase活性は野生型RuvBと同程度で、その活性は野生型RuvBと同様にDNAにより促進された。しかし、RuvAとDNAによる相乗的な促進は見られなかった。また、RuvAとの複合体が形成できず、Holliday構造－RuvAB複合体形成能も低下し、機能的にも物理的にもRuvAとの相互作用に欠損があることが認められた。また、DNA非存在下で、六量体形成が観察されなかったが、DNAに対する結合能は野生型RuvBと同程度であった。しかし、電子顕微鏡による観察からDNA上での六量体リング構造は観察されたが野生型RuvBとは異なる形態をしていた。これらの結果からRuvB-I148T、RuvB-I150TがRuvAとの相互作用に欠損があるだけでなく、六量体形成にも影響していることが認められた。

最近、私の研究室では生物分子工学研究所の森川博士のグループとの共同研究により、高度好熱性真正細菌（Thermus thermophilus）のRuvBの立体構造を決定した。Ile148、Ile150はAAA$^+$ATPase domainから突き出たβ－hairpin上に位置し、そのβ－hairpinは他のAAA$^+$ATPaseに見られないRuvB特異的な構造であった。RuvBの立体構造を六量体リング構造が決定されたNSF-D2やHslUに重ね合わせて、六量体リング構造のモデルを作成したところ、β－hairpinはリング構造の表面に位置していた。また、その面は電子顕微鏡によるHolliday構造－RuvAB複合体の観察からRuvAの方向に向いているという報告があり、このβ－hairpinはRuvAとの接触面を構成していることが示唆される。六量体形成はAAA$^+$ATPase domainのBox ⅥとⅦと呼ばれる領域が関与して

いると考えられており、この2つの領域は一次構造上、β－hairpin 領域を挟むように位置しているだけでなく、立体構造上も近接していたことから、Ile148、Ile150は六量体形成に直接関与しているというよりも、むしろアミノ酸変異が構造に影響を与え、その結果2つの変異体蛋白質の六量体形成に影響したと考えられる。

また、野生型 RuvB に RuvB-I148T または RuvB-I150T を加えて branch migration 反応を行ったところ、反応産物の量の上昇が観察された。この結果は、単独では RuvA との相互作用ができない結果、branch migration ができない変異体蛋白質が野生型 RuvB の助けにより Holliday 構造に結合できるようになり、なおかつ branch migration 活性を持つ heterooligomer が形成されていることが示唆される。つまり、branch migration 反応において、六量体リングである RuvB はその全てのサブユニットが RuvA と同時に相互作用する必要がないことが示唆される。

論文審査の結果の要旨

RuvB 蛋白質は RuvA 蛋白質と複合体を形成し、相同組換えの中間体である Holliday 構造の分岐点移動反応においてモーター蛋白質として働く。本研究では、AAA^+ファミリー ATPase に見られない RuvB 特異的な領域に変異のある148番目のイソロイシンがスレオニン（I148T）に、150番目のイソロイシンがスレオニン（I150T）に変異した2つの変異体について詳しく解析した結果、ATPase 活性、DNA 結合能は野生型 RuvB と同程度であるが、RuvA との相互作用が欠損していることを明らかにし、この RuvB 特異的な領域が RuvA との相互作用に関与していることを明らかにした。

これらの知見は RuvB の構造と機能の相関関係や相同組換え後期過程の詳細な反応機構を明らかにする上で重要な情報を与える。よって博士（理学）の学位論文として十分価値のあるものと認める。