The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Modulation of RuvB function by the mobile domain III of the Holliday junction recognition protein RuvA
Author(s)	西野, 達哉
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42571
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

【115】

氏　　名	西野達哉（にしのたつや）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　16122　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 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Modulation of RuvB function by the mobile domain III of the Holliday junction recognition protein RuvA （遺伝子相同組み換え中間体 Holliday 分岐結合タンパク質 RuvA のドメインIIIによると RuvB 活性の調節）
論文審査委員	（主査） 教　授　森川　耿右 （副査） 教　授　堀井　俊宏　　教　授　田中亀代次

論文内容の要旨

【目的】

遺伝子の相同組み換えは染色体損傷の修復に関係するとともに生物の個体差を決定づける重要な現象である。更に、外部遺伝子の獲得にも密接に関係しており、染色体工学等の応用的観点からも重要である。Holliday 分岐は、DNA 相同組み換えの普遍的中間体であり、組み換え機構において中心的な役割を果たす。正常な個体を作るために Holliday 分岐のプロセッシングと切断は不可欠であり、その活性を担う酵素はすべての生物において普遍的に存在する。この様に、Holliday 分岐と蛋白質の特異的認識機構の解明は、構造生物学的に重要な課題である。本研究の目的は、この Holliday 分岐の分子認識機構を立体構造の観点から解明することにある。

大腸菌 RuvA－RuvB タンパク質複合体は、相同組み換えの普遍的中間体 Holliday 分岐に結合し、DNA の分岐点移動を促進することが知られている。RuvB は ATP 依存性 DNA ヘリケースとして分岐点移動反応に関与するモータータンパク質である。RuvA は 4 量体を形成し、RuvB 6 量体と DNA の両方に結合する。こうして移動反応のターゲットである Holliday 分岐との相互作用を仲介すると考えられている。

【方法ならびに成績】

まず、RuvA タンパク質の構造と機能の関係を明らかにするために、RuvA の変異体を作成し、その機能が変化するものを多数得た。これらの変異タンパク質を生化学的に解析し、Holliday 分岐に結合できないものと RuvB との結合能に異常がみられるものに分類した。

この研究と平行して、RuvA の三次元構造を解明するためにX線結晶構造解析を行い、RuvA の立体構造を2.5Å分解能で決定した。RuvA は、結晶中でもそれぞれの単量体が花びらのように折り重なっている 4 量体を形成し、単量体の構造は 3 つのドメインから構成されていた。ドメインⅠでは、4 量体形成に必須なサブユニット間水素結合を形成していた。ドメインⅡは DNA 結合に重要なヘリックスヘアピンヘリックスモチーフを二つ含み、この部分に変異が生じると Holliday 分岐結合に異常が生じた。ドメインⅡとⅢは電子密度が確認できない約20残基の柔軟なループで隔てられていて。ドメインⅢは隣のサブユニットのドメインⅠおよびⅡと疎水的な相互作用により結合していた。RuvB と結合できない変異体はドメインⅢの一領域に集中しており、この領域が RuvB との相互作用に重要であることが示唆された。

RuvA のユニークなドメイン構造と機能的意義を明らかにするため、次にドメインⅠ、Ⅱ（NH 2 region）とドメ

インⅢをそれぞれ単独で発現し、機能および構造解析を行った。まず、遺伝学的解析からそれぞれのドメインは一部の機能が失われていることがわかった。次に、それぞれのタンパク質を精製し、RuvABによる分岐点移動反応に加えるとこれを阻害する事実が判明した。ドメインⅠとⅡを含むNH 2 regionは全長RuvAと同様にHolliday分岐に結合する一方、ドメインⅢはRuvBのATP水解活性反応を特異的に阻害した。次に、NH 2 regionのX線結晶構造解析を行い、2.5Åで立体構造を決定した。構造は全長RuvAの対応する領域と同一であり、この部分のみで4量体形成もHolliday分岐との結合も可能なことが確認できた。さらに、全長RuvAとNH 2 regionの溶液中での構造を観察するためにX線小角散乱を測定した。NH 2 regionは結晶と溶液中で構造に差がなかったのに対して、全長RuvAは構造変化を起こし、水溶液中でドメインⅢが自由に動き回っていることが示唆された。

【総括】

今回の解析から、RuvAはRuvBと複合体を形成するだけでなく、ドメインⅢの動的性質を利用してRuvB活性を調節することが示唆された。こうして、RuvAの特徴的なドメイン構造は、それぞれ別の機能を合理的に割り当てる意義をもつことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

DNA相同組み換えは、損傷を受けた染色体の修復に主要な役割を果たすとともに、生物の多様性を決定する極めて重要な現象である。この相同組み換えの普遍的DNA中間体Holliday構造と蛋白質の特異的相互作用を立体構造の観点から明らかにすることは、組換えの動的分子機構を理解するために必須である。大腸菌の組み換えの後期過程では、先ずRuvA蛋白質がHolliday構造を特異的に認識して結合し、モーター蛋白質であるRuvB 6量体との会合を促進する。こうして生成した分岐点上のRuvA－RuvB複合体がATP加水分解のエネルギーを使って分岐点移動を引き起こす。西野達哉君は、博士課程の前半において、RuvA蛋白質の構造生物学的研究に集中し、この分子のHolliday分岐及びRuvBに対する特異的認識機構の解明に大きな貢献をした。即ち、RuvA蛋白質を結晶化させ、X線結晶構造解析によって、その立体構造を原子レベルの分解能で決定した。更に、種々のRuvA変異体を作成し、その機能変化をin vitro及びin vivoの系で解析を行った。その結果、RuvAの三次元構造上に、Holliday分岐DNAの結合領域と分岐点移動モーター蛋白質であるRuvBとの結合領域を同定する事に成功した。更に、この研究を発展させ、X線小角散乱や円偏光二色性の手法を駆使し、溶液中で動き回るRuvA蛋白質のドメインⅢが、RuvB蛋白質を認識し、そのATP加水分解活性を調節する能力をもつ事を見出した。

博士課程の後半では、超好熱性古細菌Pyrococcus furiosusから同定された新規のエンドヌクレアーゼHjcのX線結晶構造解析に取り組んだ。古細菌におけるDNA代謝蛋白質は、一次構造上からも機能的にも真核生物のものに類似しており、また、超分子複合体の構成は真核生物のそれに比べて単純な場合が多い。この様に、真核生物のDNA組み換え機構を解明する上で、古細菌蛋白質は優れたモデルになるものと推測される。HjcはHolliday分岐構造を特異的に認識し、分岐点近傍で切断するエンドヌクレアーゼであり、制限酵素と同じくMg^{2+}を必要とするが、塩基配列は認識しない。西野君はこのHjcエンドヌクレアーゼの立体構造をX線結晶構造解析によって原子レベルで決定することに成功した。その結果、驚くべきことに、Hjcと制限酵素の骨格構造は活性中心を含めて互いに高い類似性をもつことが解った。更に、変異体解析の結果を考慮し、HjcとHolliday分岐DNAの複合体のモデルを構築し、このヌクレアーゼはRuvAの場合とは異なる立体構造の分岐DNAを認識すると結論した。

以上、普遍的DNA組み換え中間体Holliday構造は、異なった蛋白質に結合する際、その立体構造を多様に変化させうること、また、Holliday構造認識蛋白質RuvAの特徴的ドメイン構造と機能分担の関係を明らかにした研究成果は充分学位に値するものと認める。