



Title	Novel properties of the <i>Thermus thermophilus</i> RuvB protein, which promotes branch migration of Holliday junctions
Author(s)	山田, 和弘
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42646
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	山田和弘
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16028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 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Novel properties of the <i>Thermus thermophilus</i> RuvB protein, which promotes branch migration of Holliday junctions (ホリディ構造の分岐点移動を推進する高度好熱菌由来の RuvB 蛋白質の新規特質)
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】

DNA 相同組換え後期過程で形成される Holliday 中間体に対し、その十字構造の分岐点領域上に先ず四量体 RuvA 蛋白質が結合し、RuvB 蛋白質は、この中間体上の RuvA と複合体をつくると共に、二重鎖アーム領域を外周から囲む形で六量体環状構造を形成する。Holliday 中間体-RuvA 複合体の X 線結晶解析から、DNA 鎖交換反応に伴う二重鎖 DNA の unpairing 及び pairing は、四量体 RuvA の中心から伸びた 4 本の acidic pin と呼ばれる構造の近傍で起こることが示された。一方、六量体 RuvB の役割は、DNA 鎖交換後 pairing が終了した二重鎖アーム領域に対し、恐らく回転を伴う並進運動を加えることによって、DNA 組換え領域の拡大を促進させているものと推定されている。RuvB の構造と機能の関係を明らかにするには、原子レベルでの立体構造情報が必要であり、X 線結晶解析による構造決定が待たれていた。しかし、大腸菌 RuvB の結晶化が難しく、これを克服する為に物理化学的安定性に優れた好熱菌由来の RuvB を選択した。結晶構造決定に先立ち、好熱菌 RuvB 独自の生化学的特性を解明することを目的とした。

【方法ならびに成績】

好熱菌 *Thermus thermophilus* HB 8 (以下、*Tth*) 株のゲノムからの *rvb* 遺伝子クローニングに関しては、種々のバクテリア由来の RuvB に於いて、互いに高度に保存されている WalkerA 及び B モチーフ領域を primer として作製した probe を用いてサザン解析を行った。その結果、好熱菌ゲノムを制限酵素 BamHI で処理した 2053bp 断片に *rvb* 遺伝子が含まれていたが、その上流域には *rvb* 遺伝子が存在せず、好熱菌の場合、*rvb* 遺伝子はオペロン構成を待たないことが分かった。

大腸菌で大量発現させた *Tth* RuvB 蛋白質の熱耐性に関しては、コファクターとして ATP が共存する条件で 70°C までの熱耐性が得られ、*Tth* RuvB 蛋白質の ATPase 活性を指標とした熱耐性・蛋白安定性は、主に ATP により保持されていた。尚、DNA に対する *Tth* RuvB 独自の特性として、アガロース電気泳動実験から、*Tth* RuvB 蛋白質は二重鎖 DNA (dsDNA) に対し、大腸菌 RuvB 蛋白質にはない強い結合能を示した。

合成 DNA からなる Holliday junction 基質を、*in vitro* で ATP 水解に依存的に乖離させる活性に関しては、60°C の反応温度で *Tth* RuvB 蛋白質は RuvA 非依存的に単独で促進し得ることが観察された。この特質は、他の宿主由来の RuvB では見られない好熱菌 RuvB 独自のものである。この反応は大腸菌 RuvA 蛋白質が共存すると促進され、

37°Cの反応温度下、大腸菌由来の RuvA と *Tth* RuvB で構成されたヘテロ RuvAB 複合体は、大腸菌由来の RuvAB 複合体と同様の分岐点移動活性を示した。この結果は、様々な宿主に於いて RuvAB 間の接触面構造が保存されていることを示唆する。

Tth RuvB 蛋白質自身は、ATP を含む 8 種類全てのヌクレオチド (NTP or dNTP) を同程度に水解する一方、 Holliday junction の分岐点移動反応効率は、各ヌクレオチドを用いた場合で差異が存在する。特に (d) GTP の場合、分岐点移動反応が全く見られず、ヌクレオチド水解で得られたエネルギーを Holliday junction の分岐点移動反応に利用する“伝達変換メカニズム”が、RuvB 構造中で機能していないことを意味する。このことは、ヌクレオチドの塩基構造部分を認識する RuvB 構造領域が、先の伝達変換メカニズムの上に於いて重要な役割を担っていることを予想させる。

【総括】

Tth RuvB は二重鎖 DNA に対する強い結合能があり、RuvA 非依存的に合成 DNA からなる Holliday junction 基質を乖離させ得る活性があるなど、大腸菌 RuvB には見られない独自の特性が存在する。一方で、*Tth* RuvB と大腸菌 RuvA で構成されたヘテロ複合体は、大腸菌 RuvAB 複合体とほぼ同様の ATPase 活性及び branch migration 活性を示した。即ち、RuvA・RuvB それぞれ単体の生化学的性質は、様々な宿主に於いて多少異なっても、RuvAB 分子複合体に於ける両者の接触面構造はバクテリア間で保存されていることを意味する。

論文審査の結果の要旨

バクテリアでは、DNA 相同組換え後期過程に於いて形成される Holliday 中間体に対し、その分岐点移動反応を推進させ組換え領域を拡大させるには、モーター蛋白質の一種である RuvB 蛋白質が必要とされる。RuvB 蛋白質は、自身が持つ ATP 水解能を利用して、DNA の分岐点移動を推進させる活性を持つ。本酵素の詳細な機能解析には、原子レベルでの構造情報が必須であり、X線結晶構造解析が長年待たれていた。山田和弘氏は、大腸菌に代わり、物理化学的性質に優れる好熱菌の RuvB を用いることにより、世界に先駆けて RuvB 単体での X線結晶構造解析を成功させた。この研究成果は、モーター蛋白質内部の分子動力学的メカニズム即ち、化学エネルギーから物理エネルギーの伝達変換機構の詳細を明らかにし、その謎を解く独創的研究に繋がると期待されている。以上のことから、本論文は充分に学位の授与に値するものと考えられる。