



Title	Two basic residues, Lys-107 and Lys-118, of RuvC resolvase are involved in critical contacts with the Holliday junction for its resolution
Author(s)	吉川, 学
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42660
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	吉 川 学
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 7 9 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 12 年 12 月 11 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	Two basic residues, Lys-107 and Lys-118, of RuvC resolvase are involved in critical contacts with the Holliday junction for its resolution (ホリデー構造解離酵素 RuvC レゾルベースの反応機構の解析；高度に保存された塩基性アミノ酸の機能)
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】

大腸菌 RuvC タンパク質は、相同組換えの中間体であるホリデー構造に特異的なエンドヌクレアーゼ（ホリデー構造解離酵素、リゾルベース）である。当研究室と生物分子工学研究所の森川博士のグループとで共同して行った X 線結晶解析により、RuvC タンパク質の立体構造には、活性中心をその底部にもつ大きな凹みが存在することが明らかになった。この凹みの側壁には 8 個の塩基性アミノ酸が存在し、これらの全てもしくはいくつかの残基は基質 DNA の結合に関与すると予想された。そこで、RuvC リゾルベースのホリデー構造特異的な結合及び切断の反応メカニズムを明らかにする目的で、これら 8 個の塩基性アミノ酸に変異を導入したミュータントタンパク質を作成して、詳細に解析した。

【方法及び成績】

1) *in vivo* におけるミュータントの解析

凹みの側壁上に存在する 8 個の塩基性アミノ酸をアラニンおよびグルタミンに置換した、*ruvC* 遺伝子の部位特異的ミュータントを 16 種作成した。これらのミュータント遺伝子をもつプラスミドを大腸菌 *ruvC* 欠失株に導入して、紫外線感受性を測定することにより、*in vivo* における機能を評価した。その結果、Lys-107 と Lys-118 のアラニン及びグルタミン置換ミュータント両方とも、紫外線損傷の修復欠損を示した。その他 6 個の全てのアミノ酸部位においては、アラニンもしくはグルタミン置換変異のどちらかもしくは両方が、野生型遺伝子と同等の修復活性を示した。Lys-107 と Lys-118 のアラニン及びグルタミン置換ミュータント遺伝子をもつプラスミドを野生型株に導入すると、宿主を紫外線高感受性にする負の優性効果 (negative dominancy) を示した。これらの結果は、*in vivo* で Lys-107 と Lys-118 残基が特異的に重要な機能を担っていることを示唆する。

2) 生化学的解析

これらのアラニン置換体 (K107A 及び K118A) を精製し、*in vitro* で詳細な解析を行った。その結果、37℃においては、いずれのミュータントタンパク質によるホリデー構造特異的エンドヌクレアーゼ活性は認められなかったが、反応温度を 55℃に上げると有意な活性の上昇が認められた。このことは、これらのミュータントタンパク質において、DNA 加水分解の化学反応そのものに重要な欠損は無いことを示唆する。

次に、ゲルシフトアッセイを行い、ミュータントタンパク質のホリデー構造結合能を解析した。その結果、これら 2 種のミュータントタンパク質では、 Mg^{2+} イオン存在下でも高塩濃度条件下で基質に対する結合能が低下することが判明した。この結果は、Lys-107 と Lys-118 残基は、ホリデー構造 DNA との静電的な結合に関与していることを強く指示する。加えて、DNA の加水分解に直接関与する残基のミュータントである D7N では、 Mg^{2+} イオンが存在しなくても、高塩濃度条件下で基質に結合できることが判明した。

3) コンピューターによる立体構造の解析

RuvC は共通のタンパク質の折畳み構造から、RNaseH ファミリーに属する。このファミリーには、RNaseH 以外に、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のインテグラーゼ、バクテリオファージ Mu の MuA 転移酵素等が含まれるが、後者の 2 種間以外、アミノ酸の一次配列上の相同性がほとんど見られない。しかし、RNaseH ファミリータンパク質では、3 個もしくは 4 個の酸性アミノ酸で構成される活性中心のトポロジーに共通性が見られるのが特徴である。新たにコンピューターによる立体構造の解析から、他の RNaseH ファミリータンパク質にも、今回同定した RuvC の Lys-107 と Lys-118 に相当する塩基性残基が、立体構造上対応する位置に存在することが判明した。

【総括】

負の電荷を帯びている RuvC の活性中心は、同じく負の電荷をもつ DNA のリン酸と Mg^{2+} イオンを配位することにより、加水分解の中間体を形成すると考えられるが、Lys-107 と Lys-118 残基は、切断部位付近で DNA のリン酸と結合することにより、この反応中間体をさらに安定化するように働いていると予想される。このモデルは、コンピューターシミュレーションによる RuvC-ホリデー構造複合体モデルと矛盾が無くよく一致する。さらに、この 2 種のアミノ酸残基は、他のバクテリアの RuvC においても高度に保存されており、このことは、この 2 種の残基の重要性をさらに強く支持する事実である。

RuvC の Lys-107 と Lys-118 に相当する塩基性残基が、RNaseH ファミリータンパク質間で立体配置上よく保存されている。このことは、個々の酵素で基質が異なるものの、このファミリータンパク質による DNA 加水分解や DNA リン酸転移反応の根本的な化学反応の基本メカニズムは保存されていることを強く示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究では、大腸菌の相同組換えの中間体ホリデー構造を特異的に切断するエンドヌクレアーゼ RuvC タンパク質について、その反応機構を解明するために、部位特異的変異体を作成して解析をした。

RuvC タンパク質の結晶構造から塩基性アミノ酸に富んだ凹み構造が、ホリデー構造との結合や DNA の切断反応に関与している可能性が考えられた。この凹みの表面の 8 種類のアミノ酸をアラニン及びグルタミンに変えたミュータント遺伝子を作成し、*in vivo* における紫外線感受性の相補性を指標にして、Lys-107 と Lys-118 が RuvC の機能に重要であることを明らかにした。さらに、この二つの残基について詳細な解析を進めるためにそれぞれのミュータントタンパク質 (K107A 及び K118A) を精製し、生化学的性質を解析した。その結果、Lys-107 と Lys-118 はいずれも、ホリデー構造との結合に関与しており、さらに DNA 加水分解反応の中間体の形成に重要な機能を果たしていることを明らかにした。さらに、構造生物学上、RuvC と共通のファミリーに属する他の酵素にも機能上これらに対応する重要な塩基性アミノ酸が存在が示唆された。

以上、本研究では RuvC タンパク質によるホリデー構造切断の反応機構の解明に重要な貢献をし、学位に値するものと考えます。