The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural and biochemical studies on the roles of the motifs conserved in exonuclease RecJ for nuclease reaction and metal binding
Author(s)	山形, 敦史
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43608
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

【50】

氏　　名	山形敦史（やまがたあつし）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　16781　号
学位授与年月日	平成14年3月25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	Structural and biochemical studies on the roles of the motifs conserved in exonuclease RecJ for nuclease reaction and metal binding （RecJに保存されたモチーフのヌクレアーゼ活性と金属結合に果たす役割の構造学的・生化学的研究）
論文審査委員	（主査） 教　授　福山　恵一 （副査） 教　授　品川日出男　　教　授　升方　久夫

論文内容の要旨

DNAは紫外線照射や化学物質によって様々な傷害を生じる。生物はDNA組換えやDNA修復の系を用いてそれらの傷害を取り除いている。RecJは一本鎖DNAを5'から3'方向にのみ分解するエキソヌクレアーゼとして、相同組換え、塩基除去修復、ミスマッチ修復に重要な役割を果たす。その分子量は約55kで、5つの特徴的なモチーフ（Motif I～V）が存在する。このモチーフを持つタンパクは原核生物から古細菌、高等真核生物まで広く存在し、DHHファミリーと呼ばれるファミリーを形成するが、それらのうちで生化学的性質の分かっているものはRecJと出芽酵母のポリリン酸分解酵素（PPX1）の二つのみである。また、RecJを含むDHHファミリーの立体構造は明らかにされておらず、これらのモチーフの構造と機能の関連は明らかでなかった。

そこで本研究では

1）RecJとそのコアドメインの発現・精製、および生化学的解析

2）RecJのX線結晶解析法による立体構造解析

3）立体構造と変異体解析を基にしたRecJの活性残基の同定

を行った。

1）RecJとそのコアドメインの発現・精製、および生化学的解析

まず、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8由来の *recJ* 遺伝子（*ttrecJ*）を　PCR法を利用してクローニングした。大腸菌内で発現させたttRecJは封入体を形成したが、尿素による可溶化の後、透析法によって再生し、精製を行った。次にサーモライシンを用いて限定分解を行った結果、分子量約43kの安定なバンドが検出された。N末端アミノ酸シーケンスとホモロジー検索を利用してこのバンドを同定したところ、DHHファミリーの5つのモチーフ全てを含む、40から463番目の領域（cd-ttRecJ）であると考えられた。さらにcd-ttRecJを大腸菌内で発現させると可溶性画分に含まれており、これを精製した。ttRecJとcd-ttRecJは両者とも約60℃までの熱安定性を示し、エキソヌクレアーゼ活性も保持していた。その活性はMg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}がそれぞれ存在するときに見られたが、その他のイオンでは検出できなかった。この金属特異性は酵母のPPX1のものと同じであり、DHHファミリーのモチーフが両酵素の金属結合に関与していると示唆された。

2）RecJのX線結晶解析法による立体構造解析

精製したcd-ttRecJを硫酸アンモニウムを沈殿剤としてMn^{2+}存在下で結晶化した。次にSe-Met置換cd-ttRecJの結晶を用いて、single-wavelength anomalous dispersion（SAD）法により位相決定し、2.9Åの分解能でその立体構造を精密化した（R値＝22%）。RecJは、二つのドメインを一本の長いαヘリックスがつなぐという特徴的な構造をしており、分子の中央に深い溝を形成していた。その溝はArgやAsnといったDNAに結合しうる残基によって構成され、それらの残基はRecJ間で高度に保存されていた。溝の幅は約10Åと二本鎖DNAの直径（約20Å）より狭く、一本鎖DNAへの特異的な結合に適していると考えられた。Mn^{2+}はDHHファミリーの5つのモチーフのうちMotif Ⅰ～Ⅳのそれぞれで保存されているAsp，His残基によって配位されていた。

3）立体構造と変異体解析を基にしたRecJの活性残基の同定

決定した立体構造から活性に関与すると予想されるAsp82（Motif Ⅰ），His161（Motif Ⅲ）の部位特異的変異体を作製した。またMotif Ⅴで保存されるHis349の変異体、His161の近傍にあるTyr115の変異体も作製した。これらの変異体の活性を測定した結果、Asp82，His161，His349で活性の消失や著しい低下が見られた。これらの結果をもとに、Asp82が求核攻撃性の水分子との結合、His161がDNAのO3'原子のプロトン化、His394がDNAとの安定な結合、といった役目を担うというメカニズムを考えた。

論文審査の結果の要旨

RecJ蛋白質は相同組換えや修復系において重要な役割を果たしている一本鎖DNA特異的エキソヌクレアーゼで、そのホモログ群は原核生物から真核生物まで広く分布する（DHHファミリー）。山形敦史君は高度好熱菌*Thermus thermohilus* HB8のRecJの発現・精製に取り込み、DHHファミリー特有のモチーフを全て含むコアドメインを単量体として調製した。X線結晶解析法によりRecJは二つのドメインの間に深い溝を持つというユニークな構造を持ち、溝ではモチーフを構成するアミノ酸残基がMn^{2+}イオンを配位していた。また、ヌクレアーゼ活性に対するこれらのアミノ酸残基の関与や金属イオンに対する特異性なども実験的に明らかにした。このようにRecJの立体構造と生化学的解析により、その反応メカニズムの理解を深めた。この結果は博士（理学）の学位論文として十分価値にあるものと認める。