

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43608">https://hdl.handle.net/11094/43608</a>                                                                                                                                                                                  |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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 形 敦 史                                                                                                                                                                                  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理 学)                                                                                                                                                                                |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 6 7 8 1 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<br>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<br>(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)<br>教 授 福 山 恵 一<br><br>(副査)<br>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 とそのコアダメインの発現・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 とそのコアダメインの発現・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、2.9 Å 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  $\alpha$  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 10 Å と二本鎖 DNA の直径 (約 20 Å) 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 thermophilus* 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。