

Title	Analysis of Holliday junction migration mechanism by RuvB motor protein : Functions of the three domains of RuvB protein
Author(s)	大西, 隆之
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/44040">http://hdl.handle.net/11094/44040</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	大西隆之
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 17536 号
学位授与年月日	平成 15 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	Analysis of Holliday junction migration mechanism by RuvB motor protein : Functions of the three domains of RuvB protein (RuvB モータータンパク質による Holliday 構造分岐点移動の機構の解析 : RuvB タンパク質の 3 つのドメインの機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 品川日出夫  (副査) 教授 野島 博 助教授 篠原 彰

### 論文内容の要旨

大腸菌 RuvB タンパク質は DNA 相同組換えの後期過程において、Holliday 構造結合タンパク質である RuvA と複合体を形成し、ATP の加水分解のエネルギーを利用して Holliday 構造の分岐点移動反応を促進するモータータンパク質である。最近決定された高度好熱性細菌由来の RuvB の結晶構造によると、RuvB は 3 つのドメイン構造をとっており、ドメイン I (1-181) と II (182-263) は AAA+ファミリーに特徴的な構造を示している。ドメイン I には ATP の結合と加水分解に必要な Walker A、B 及び sensor-1 モチーフがあり、sensor-2 モチーフはドメイン II にある。ドメイン III (264-336) は転写因子などの DNA 結合ドメインでよく見られる Winged helix 構造をしている。それぞれのドメインの機能を詳しく調べる目的で、RuvB のドメイン I だけを持つ D1 や、ドメイン I と II を持つ D1-2 などをコードするドメイン欠失型変異遺伝子を作成し、解析を行った。

上記のどの欠失変異体をコードするプラスミドを *ruvB* 欠失株に導入しても紫外線感受性を相補しなかった。野生型株に導入すると D1 と D1-2 は野生型株を紫外線感受性にするドミナントネガティブの表現型を示し、野生型の機能を阻害することが示唆された。D1-2 は ATPase 活性があるのに対し、D1 は ATP 結合能が減少しており、ATPase 活性を失っていた。この結果から ATPase 活性と ATP 結合活性には Walker A、B に加え、sensor-1、-2 モチーフが必要であることが示唆された。D1-2 は RuvA との相互作用、ATPase 活性、オリゴマー形成能を持つが、分岐点移動活性は持たなかった。DNA 結合ドメインモチーフを持つ D3 には DNA 結合活性を検出できなかった。これらの結果は RuvB の DNA への結合には DNA 結合ドメインだけでなく、オリゴマー形成などのドメイン I と II の機能も必要であることを示唆している。

ドメイン III の Winged helix 構造で機能に重要なのは  $\alpha 12$  の recognition helix と  $\beta 11$  から  $\beta 12$  までで構成される wing 部分の 2 つである。以前に単離されたドメイン III の変異体の一つ (R318C) は wing 領域に位置し、ドミナントネガティブの表現型を示した。そこで、私はドメイン III が DNA 結合に重要であることを調べるために Arg318 における 2 つの部位特異的変異体 (R318K と R318A) を作成し、解析を行った。その結果、R318A 変異体タンパク質は DNA 結合活性がなく、DNA による ATPase 活性の促進効果が見られなかった。これらの結果は、ドメイン III が DNA 結合に必要であり、Arg318 が DNA との結合に直接関与していることを示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

高度好熱性細菌由来の RuvB の結晶構造の解析によって、RuvB は3つのドメイン構造をとっていることが明らかになった。本研究では大腸菌 RuvB タンパク質のそれぞれのドメインの機能を詳しく調べることを目的として、種々のドメイン欠失型 RuvB をコードする *ruvB* 変異遺伝子を作成し、解析を行った。その結果、RuvB のドメイン I と II が ATPase 活性や六量体形成に協調して働くことが必要であり、ドメイン III は DNA 結合ドメインとして機能するが、RuvB の DNA への結合にはドメイン I や II と協調して働くことが必要であることが示された。また、ドメイン III の Arg318 における部位特異的変異体の解析により、Arg318 が DNA との結合に直接関与することが示唆された。これらの知見は RuvB の構造と機能の相関を明らかにする上で重要な知見であり、博士（理学）の学位論文として十分に価値があるものと認める。