The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	大腸菌RNase HIの触媒機構に関する研究
Author(s)	津中, 康央
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44903
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

【6】

氏　　名	津　中　康　央（つ なか やす お）
博士の専攻分野の名称	博　士（工　学）
学　位　記　番　号	第　18657　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科物質・生命工学専攻
学　位　論　文　名	**大腸菌 RNase HI の触媒機構に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　金谷　茂則 （副査） 教　授　卜部　　格　　教　授　宮田　幹二　　教　授　福住　俊一 教　授　柳田　祥三　　教　授　横山　正明　　教　授　高井　義造 教　授　伊東　一良　　教　授　青野　正和

論文内容の要旨

本論文では、大腸菌リボヌクレアーゼ HI（RNase HI）の触媒機構に関する研究を行い、同じタンパク質スーパーファミリーの他の酵素の触媒機構との類似点について論じている。

序論では、タンパク質スーパーファミリーを念頭において研究を行うことの重要性及び、RNase H とそれが属するポリヌクレオチド基転位酵素スーパーファミリーの酵素の触媒機構に関する研究の背景に触れ、本研究の目的について述べている。

第一章では、大腸菌 RNase HI の活性部位における基質 RNA 鎖との相互作用に関する情報を得ることを目的に、RNase H の触媒作用への基質 3′ 側隣接リン酸基の寄与を解析している。この基質 3′ 側隣接リン酸基の触媒作用への寄与は、RNase H と同じファミリーに属する Type-II 制限酵素に対して提案されている。その結果、基質の 3′ 側隣接リン酸基は、His^{124} のイミノプロトンと *pro-Rp* 酸素原子の間に水素結合を形成することにより、リン酸基を求核攻撃する水酸化物イオンを活性化するのに最適な位置に His^{124} を配向させるのに寄与していることを明らかにしている。このような大腸菌 RNase HI の触媒反応での 3′ 側隣接リン酸基の寄与は、Type-II 制限酵素でのリン酸基を求核攻撃する水酸化物イオンの活性化に関与する残基を助けるという点で類似している。この点から、RNase H と同じファミリーの他の酵素にもこれらのことがあてはまる可能性があることを示唆している。

第二章では、RNase H の金属結合部位や触媒機構に関して有益な情報を得ることを目的に、二価金属イオンの代わりにアミノ酸置換により活性部位に正電荷を導入した D10R/E48R 変異型 RNase HI の詳細な酵素学的諸特性の解析を行っている。その結果、本変異型酵素が核酸と強く結合し、インビボ、インビトロ両方の条件で不活性であることを明らかにしている。以前の報告と矛盾する今回の結果は、RNase H 活性測定法の相違によると考えられる。この結果は、これまで提案されている触媒機構が正しいことを示唆している。

第三章では、Mn^{2+} 存在下と Mg^{2+} 存在下での大腸菌 RNase HI の触媒機構の違いを明らかにすることを目的に、活性部位変異型酵素の Mn^{2+} 存在下での活性を調べると共に、Mn^{2+} 結合様式の解析を行っている。その結果、Glu^{48} と Asp^{134} が大腸菌 RNase HI の Mn^{2+} 依存性の活性に必須でないことを示している。また、野生型酵素と変異型酵素による基質の切断特異性の比較、Mn^{2+} イオンの結合分析により、一つめの Mn^{2+} が Glu^{48} や Asp^{134} の変異型酵

素に Site 1 又はその付近の部位で、野生型酵素に比べ弱い親和性ながら結合することを示唆している。これらのことから、Mg^{2+} 存在下の触媒機構とは異なる、Glu^{48} と Asp^{134} を必要としない新たな One-Mn^{2+} form の触媒機構を提案している。

第四章では、第三章で示唆された Glu^{48} や Asp^{134} の変異型酵素の Mn^{2+} 結合部位は、酵素の活性化に必要な一つめの Mn^{2+} 結合部位を反映していると考えられるので、その部位を同定することを目的に、E48A/D134N^{C} 変異型酵素と Mn^{2+} との複合体の結晶構造解析を行っている。その結果、Mn^{2+} イオンは二つの分子の活性部位にそれぞれ一つだけ、Asp^{10} と Asp^{70} の間に比較的高い温度因子でもって結合しており、その位置はわずかに異なることを明らかにしている。このことから、酵素の活性化に必要な Mn^{2+} は、Asp^{10} と Asp^{70} の間を揺らぎながら結合しており、触媒作用の各過程で最適な位置を移動している可能性を示している。また、His^{124} の Mn^{2+} 依存性の活性における役割についても解析を行い、Mg^{2+} の時と同様に、触媒作用に重大な影響を与えていることを示している。それに加え、His^{124} と Mn^{2+} 結合の間に何らかの相関関係があることも示している。

総括では、本研究から得られた知見をもとに、ポリヌクレオチド基転位酵素スーパーファミリーの酵素の触媒機構に関する問題を解決する新たな提案を行っている。また、エイズウィルスの RNase H ドメインと大腸菌 RNase HI の類似性を踏まえた上で、今回得られた知見がエイズ治療薬としての RNase H 活性阻害剤設計に寄与することにも言及している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、大腸菌 RNase HI の触媒機構に関して、同じタンパク質ファミリーの他の酵素の触媒機構との類似点を念頭におき、触媒作用における基質の寄与や二価金属イオンの役割を明らかにすることを目的として行われた結果、以下に示す知見を得ている。第一章では、RNase H の触媒作用への基質 3′ 側隣接リン酸基の寄与を解析し、このリン酸基が RNase H と同じファミリーに属する Type-II 制限酵素同様 RNase H の触媒作用に対しても寄与していることを明らかにしている。第二章では、二価金属イオンの代わりにアミノ酸置換により活性部位に正電荷を導入した D10R/E48R 変異型 RNase HI の解析を行い、本変異型酵素がインビボ、インビトロ両方の条件で不活性であることを明らかにしている。第三章では、大腸菌 RNase HI 活性部位変異型酵素の Mn^{2+} 存在下での活性を調べると共に、Mn^{2+} 結合様式の解析を行い、Glu^{48} と Asp^{134} が大腸菌 RNase HI の Mn^{2+} 依存性の活性にも Mn^{2+} 結合にも必須でないことを明らかにしている。第四章では、E48A/D134N^{C} 変異型酵素と Mn^{2+} の複合体の結晶構造解析を行い、酵素の活性化に必要な Mn^{2+} は Asp^{10} と Asp^{70} の間を揺らぎながら結合しており、触媒作用の各過程で最適な位置を移動している可能性を示している。最後に総括において、これらの知見に基づいて、ポリヌクレオチド基転位酵素スーパーファミリーの酵素の触媒機構に関する問題を解決する新たな提案を行っている。

以上のように、本論文は大腸菌 RNase HI とポリヌクレオチド基転位酵素スーパーファミリーの酵素の触媒機構に関する類似点を指摘し、これらのタンパク質ファミリー酵素の触媒機構を理解する上で有益な知見を与えるものであり、本論文は博士論文として価値あるものと認める。