



Title	Studies on Hjm helicase from the hyperthermophilic archaeon, <i>Pyrococcus furiosus</i> : Identification and biochemical characterization
Author(s)	藤兼, 亮輔
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45590
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	藤 兼 亮 輔
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 19210 号
学位授与年月日	平成 17 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	Studies on Hjm helicase from the hyperthermophilic archaeon, <i>Pyrococcus furiosus</i> : Identification and biochemical characterization (超好熱性アーキアの Hjm ヘリカーゼに関する研究 : 新規 DNA ヘリカーゼの同定とその機能・構造解析)
論文審査委員	(主査) 教授 品川日出夫 (副査) 教授 篠原 彰 教授 升方 久夫 教授 石野 良純

論 文 内 容 の 要 旨

本論文では超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* より新規ヘリカーゼを同定し、生化学的および構造生物学的をもちいて解析を行っている。

(1) 新規 DNA ヘリカーゼの同定

アーキアの分岐点移動反応を担う分子を同定するため、まず、*P. furiosus* 細胞抽出液を様々なカラムクロマトグラフィーで分画し、画分から分岐点移動活性を検出した。この活性は 10 mM ATP、5 mM MgCl₂ 低塩濃度の反応条件で最も強い活性を示したため、この反応条件を用いて *P. furiosus* のコスミドゲノムライブラリーから作成した耐熱性画分に対してホリディ構造を解く活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、ポジティブクローンを得ることに成功し、部分配列からデータベースを用いてヘリカーゼをコードするある ORF を同定した。この遺伝子を *hjm* (Holliday junction migration) と名付け解析した。*Hjm* がアーキアで高度に保存されていることから、この遺伝子は生体内で重要な働きを担っていると考えられる。また、高等真核生物 Pol Θ と相同性を示す一方で、*Bacteria* や *fungi* にはそのホモログは見つからない興味深い遺伝子であることが分かった。

(2) 新規 DNA ヘリカーゼ *Hjm* の機能解析

組換え *Hjm* タンパク質を大腸菌を用いて産生し、精製して生化学的解析を行った。*Hjm* は 3'→5' 方向のヘリカーゼであり、DNA 依存的な ATPase 活性を持つことが分かった。ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、*Hjm* は溶液中にモノマーで存在すると考えられた。DNA への結合活性を gel mobility shift assay を用いて調べた結果、*Hjm* は ssDNA 領域を持つ DNA に対して親和性を示し、特に、Y 構造や、ギャップを持つ複製フォーク様構造に特異的な親和性を示した。また、そのヘリカーゼ活性が大腸菌 RecQ ヘリカーゼの活性とよく似ていたことから *Hjm* が大腸菌 *recQ* 変異を相補できるかどうかを大腸菌 *dnaE486recQ* 変異株を用いて調べた。変異株に *hjm* 遺伝子をプラスミドを用いて供給したところ、*dnaE486recQ* 株の温度感受性が回復し、*hjm* が *recQ* 変異を相補できることが分かった。このことから、*Hjm* は生体内で RecQ と同様な基質を認識していることが示唆される。また、ほとんどすべてのアーキアには配列上 RecQ のホモログは存在しないことから *Hjm* がアーキア生体内で RecQ の機能的ホモログとして働く

ことが予想された。

(3)新規 DNA ヘリカーゼ Hjm の構造解析

Hjm ヘリカーゼの分子機構を解明するため、生物分子工学研究所との共同研究で X 線結晶構造解析を試みた。1.6 M の硫酸アンモニウムを沈殿剤として用い、0.1 M citrate pH5.0 の条件下で結晶化を行った。ビームライン PF BL-6B でデータ採集し 2.4 Å の解像度のデータを得た。解析の結果、Hjm は 5 つのドメインから構成されヘリカーゼモチーフを含むドメインは既知のスーパーファミリー 2 ヘリカーゼとよく似ていた。一方、他のドメインは非常に α -ヘリックスに富んだ構造をしており、既知の構造と相同性を示さない新規の構造を取っていた。

(4)新規 DNA ヘリカーゼ Hjm のドメイン解析

Hjm ヘリカーゼの各ドメインの機能を知るために構造情報を元にドメインを欠損させた変異体を作成し、生化学的解析を行った。その結果、ドメイン 4 はヘリカーゼ活性に必須であることが分かった。また、ドメイン 1-2-3 からなる変異体は DNA 非依存的な ATPase 活性を示すようになり、また、耐熱性が劇的に減少することからドメイン 4 が ATPase 活性の調節を担っており、Hjm の熱安定性に関与していると考えられる。ドメイン 3 の欠失により DNA 結合活性が失われることからドメイン 3 は DNA 認識に直接関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本学位申請者は、超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* の細胞抽出液を分画した後、分岐点移動活性を指標にしたスクリーニングにより、目的の活性を検出した。さらにその活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を突き止め、新規 DNA ヘリカーゼ Hjm (Holliday junction migration) をコードする遺伝子 *hjm* と名付けた。さらに Hjm ヘリカーゼの組換えタンパク質を大腸菌を用いて産生し、その生化学的な解析を詳細に行った。Hjm のヘリカーゼ活性が大腸菌の RecQ の性質に類似していたことから、大腸菌 *recQ* 変異体を用いた遺伝学的な解析を行ない、部分的な相補が見られたため、Hjm は細胞内で、大腸菌 RecQ と同じ基質を認識して機能しうることを示唆した。このことは、真核生物、真正細菌で RecQ ヘリカーゼが保存されているのに対し、配列上 RecQ ホモログが見つからないアーキアでこの Hjm が RecQ の機能的ホモログとして働く可能性を示した重要な知見である。また、X 線結晶構造解析により明らかにされた Hjm ヘリカーゼの立体構造をもとに、変異体作成によるドメイン解析を行うことによって、Hjm の構造と機能の関係について多くの情報を得た。特にドメイン 3, 4 に見られる Hjm 特有の構造が、この酵素のヘリカーゼ活性や ATPase 活性の調節に大きく関わっていることを示した。これらの研究成果は、独創的かつ多くの新規事項を含み、これらをまとめた本論文は博士（理学）の学位論文として十分な資格を有するものと認める。