

Title	Studies on the structure and function of RNase HIII from <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Author(s)	全, 賢基
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46899
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	全賢基
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 20271 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	Studies on the structure and function of RNase HIII from <i>Bacillus stearothermophilus</i> (<i>Bacillus stearothermophilus</i> 由来 RNase HIII の構造・機能に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 金谷 茂則 (副査) 教授 宮田 幹二 教授 菊地 和也 教授 福住 俊一 教授 横山 正明 教授 高井 義造 教授 伊東 一良

論文内容の要旨

本研究は、RNase HIII の分子機構を解明し、RNase H の分子多様性の理解に、構造生物学的な観点から新たな知見を与えることを目的とした。第一章では、中等度好熱菌 *B. stearothermophilus* から RNase HIII (Bst-RNase HIII) 遺伝子のクローニングを行い、組換え蛋白質の諸特性について常温菌 *B. subtilis* 由来 RNase HIII (Bsu-RNase HIII) と比較した。その結果、Bst-RNase HIII は Bsu-RNase HIII と同様の酵素的諸特性を示すが、高い耐熱性を示すことが分った。また、本酵素は高純度且つ大量に取得できることから、RNase HIII の構造・機能相関を研究するための材料として適することが分った。第二章では、Bst-RNase HIII の結晶構造を、RNase HIII の立体構造として世界ではじめて決定した。その結果、Bst-RNase HIII の構造は大きく分けて N 末端ドメインと C 末端ドメインからなり、C 末端ドメインは大ドメインと小ドメインに分けられることを明らかにした。C 末端ドメインの構造は古細菌 RNase H II と類似していることが明らかになった。また、RNase HIII の活性中心の構造は RNase H I や H II とよく類似していることを明らかにした。さらに、N 末端ドメインがアミノ酸配列的にも三次構造的にも TATA-box binding protein (TBP) に類似していることをはじめて明らかにした。第三章では、結晶構造に基づいて設計した Bst-RNase HIII の変異型蛋白質の解析を行い、各ドメインの、基質認識機構、触媒機構について解析した。活性中心変異体の酵素活性や基質との相互作用を解析することにより、RNase HIII の触媒機構は RNase H I や RNase H II と類似していることを明らかにした。N 末端ドメイン、C 末端ヘリックス、あるいはその両方を削除した変異体の酵素活性や基質との相互作用を解析することにより、これらの領域は基質結合に関与することを明らかにした。また、N 末端ドメインが基質結合において主要な役割を果たすことを明らかにした。さらに Bst-RNase HIII の基質切断部位特性を決める因子は大ドメインにあることを明らかにした。Bst-RNase HIII が基質に結合すると、蛋白質、基質、又はその両方の構造が大きく変化することを提案した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、これまでほとんど解析されていなかった RNase HIII の分子機構を、初めて構造的に特徴付けした点で意義深い。第二章では、活性に必要な金属イオンと Bst-RNase HIII との複合体結晶構造を明らかにした。また、第三章では、保存されている 4 残基の酸性アミノ酸が活性部位を構成することを明らかにした。これらの結果、RNase H は Type 1 RNase H であっても Type 2 RNase H であっても同様の触媒機構を有することが確かめられた。一方、第三章において、RNase HIII はこれまで解析された RNase H にはない特徴的な基質結合部位 (TBP 様 N 末端ドメイン) を持つことを明らかにした。このことから、RNase H は基質結合部位と触媒部位がシャッフリングされることによって、その分子機能が多様化したことを提案した。

本研究はさらに、RNase HIII の N 末端ドメインが、アミノ酸配列、構造、機能のすべての点で TBP と類似していることを明らかにした点で意義深い。RNase HIII と TBP の類似性は、アミノ酸配列を比較するだけでは見出されなかったもので、本研究は、立体構造を比較してはじめて類似性を見出すことができるというモデルケースになるかもしれない。TBP は細菌には存在せず、RNase HIII は細菌からしか見つかっていない。しかし、これらの蛋白質に進化的関係がないとはいえない。なぜなら、ある蛋白質が、他の蛋白質のドメインとして存在する場合があるからである。そこで今後、RNase HIII の N 末端ドメインが DNA と結合するかどうか、RNA/DNA ハイブリッドとどのような分子機構で結合するのかを解析し、分子機構の面でも TBP との類似性が見出されるかどうか比較することは意義深いと考えられる。これによって、TBP と RNase HIII の N 末端ドメインとの進化的な関係の有無を、さらに裏付けることができるものと思われる。TBP は TATA-box DNA 配列に結合するのみならず、他の蛋白質と相互作用するということに、その機能の本質がある。RNase HIII の N 末端ドメインも基質結合能以外に、他の蛋白質や DNA と相互作用するのだろうか。酵母由来 RNase H2 の場合、原核生物由来 RNase HII と異なり、三種のポリペプチドからなる複合体として機能することが報告されている。RNase H も、相互作用する相手を変化させることで、生命システムを多様化させる原動力のひとつになっているのかもしれない。

以上のように、本論文は、RNase HIII の分子メカニズムを解明することで、構造生物学的な観点から RNase H の分子多様性に新たな知見を与えたものである。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。