

Title	Structural and Functional Analysis of A Novel Allosteric Enzyme, dNTP Triphosphohydrolase
Author(s)	近藤, 直幸
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47684
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	近藤直幸
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第20877号
学位授与年月日	平成19年3月23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	Structural and Functional Analysis of A Novel Allosteric Enzyme, dNTP Triphosphohydrolase (新規アロステリック酵素 dNTP triphosphohydrolase の構造・機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀 (副査) 教授 金澤 浩 教授 福山 恵一 講師 増井 良治

論文内容の要旨

ヌクレオチド加水分解酵素は様々な生物種で幅広く分布しており、代謝経路の調節や、有害なヌクレオチドの分解によるゲノム安定性の維持など、生体内で重要な働きを担っている。その一方で、特徴的な配列モチーフに基づいてのみ、ヌクレオチド加水分解酵素として同定されているタンパク質も多数存在し、これらの機能同定はポストゲノムのタンパク質科学における重要な課題の一つである。高度好熱菌由来 dNTP トリホスホヒドラーゼ (Tt-dNTPase) は、活性に必須なヒスチジンとアスパラギン酸を持ち、リン酸ジエステル加水分解酵素に広く保存されている HD ドメインというモチーフを持つ機能未知タンパク質であったが、私の研究から DNA 合成の原料である正常なデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) をデオキシリボヌクレオシドと無機三リン酸に、幅広い塩基特異性を持って分解するタンパク質であることが明らかになった。この分解活性の発現にはマグネシウム (Mg^{2+}) と複数種類の dNTP の存在が必須であるため、Tt-dNTPase はタンパク質分子内で何らかの制御機構を持っている可能性が示唆された。

dNTP 新規合成系に関与する酵素は、最終産物である dNTP の合成量を調節する目的で、ヌクレオチドの結合による分子内制御機構を保持しているという報告が多く、Tt-dNTPase が未だ解明されていない新規のヌクレオチド代謝経路に関わる可能性が考えられる。本研究では、Tt-dNTPase の幅広い基質特異性や、複雑な制御機構の詳細を分子機能の面から明らかにする目的で、生化学的、構造生物学的解析を行った。

Tt-dNTPase のセレノメチオニン置換体を作製し、単波長異常分散法を用いて X 線結晶構造解析を行った。分解能 2.2Åでの構造解析に成功し、Tt-dNTPase は3回軸を持つ三量体リング2つが、境界面に2回軸を有して2つ連なった、ホモ六量体を形成していることが明らかになった。サブユニットは19個の α ヘリックスから成り、その内部には活性部位の HD ドメインを含む6つの α ヘリックスが存在した。高度に保存された残基に配位する金属イオンの位置と、HD ドメインを持つ他のタンパク質の基質複合体構造との構造比較から、6つの α ヘリックスの中心に活性部位が存在すると考えられた。その情報に基づいて活性部位に dNTP が結合したモデルを作成したところ、活性部位には核酸塩基を特異的に認識する残基はほとんど存在しなかったが、リン酸基を認識する残基は多数存在することが示唆された。一方、分子機能解析からは Tt-dNTPase は非天然 dNTP を含む様々な dNTP を分解するが、dNDP、dNMP は分解しない結果が得られた。これらのことから、活性部位における基質認識には三リン酸の認識が重要であること

が明らかになった。

次に、複数の dNTP 存在下での活性化機構に対する知見を得るために、X 線小角散乱法を用いて、dNTP、マグネシウム存在下での Tt-dNTPase の構造変化の有無について調べた。溶液中での分子の平均的な回転半径を表す慣性半径は、 Mg^{2+} 存在下、 Mg^{2+} /dNTP 共存下で有意に大きい値を示した。一方で、dNTP 存在下では変化が見られなかった。また、 Mg^{2+} 存在下と Mg^{2+} /dNTP 共存下の値を比較すると、後者の方が小さい値を示した。これらのことから、Tt-dNTPase は Mg^{2+} の結合により広がった構造を形成し、この場合にのみ、dNTP によるさらなる構造変化が誘導されることが示唆された。以上の結果と、更なる速度論的解析のデータとをあわせて、dNTP 制御機構と構造変化との関係を考察し、立体構造に基づいた dNTP 多段階認識モデルを提案した。

論文審査の結果の要旨

高度好熱菌由来 dNTP トリホスホヒドロラーゼ (Tt-dNTPase) は機能未知タンパク質であったが、分子機能解析の結果、DNA 合成に必要な dNTP をデオキシリボヌクレオシドと無機三リン酸とに加水分解するタンパク質であることを明らかにした。さらに、Tt-dNTPase の X 線結晶構造解析を行い、立体構造にもとづいた分子機能の解析を可能にした。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。