

Title	The Functional Analysis of Nudix Proteins from <i>Thermus thermophilus</i> HB8
Author(s)	大賀, 拓史
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48753">https://hdl.handle.net/11094/48753</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	おおがたくし 大賀拓史
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 21762 号
学位授与年月日	平成 20 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	The Functional Analysis of Nudix Proteins from <i>Thermus thermophilus</i> HB8 (高度好熱菌 <i>Thermus thermophilus</i> HB8 の Nudix タンパク質群の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 倉光 成紀  (副査) 教授 金澤 浩 教授 米崎 哲朗 准教授 増井 良治

#### 論文内容の要旨

Nudix タンパク質ファミリーは生物界に広く分布している加水分解酵素群であり、その基質分子のほとんどがヌクレオシド-二リン酸構造を持つ代謝分子 (*nucleoside diphosphate with X*) である。これらの中には傷害塩基や代謝中間体が多く含まれており、このことから Nudix タンパク質は細胞内の有害分子を除去する“house-cleaning”酵素であると考えられてきた。しかしそのような生理的な役割が証明されているのは一部の酵素のみであり、その他の多くの Nudix タンパク質は機能未知タンパク質に分類されている。また近年、構造解析をはじめとする Nudix タンパク質の生体分子としてのメカニズムの研究も盛んに行われるようになった。しかし、変異型酵素を用いた解析などの詳細な研究は十分に行われておらず、タンパク質ファミリー全体の分子機能の共通性、あるいは多様性を論じるには至っていない。本研究では高度好熱菌がもつ 8 つの Nudix タンパク質のうち 2 つについて、その分子メカニズムの解明、と生理機能の発見を目的とした機能解析を行った。

Ndx4 は ADP-ribose に対して非常に高い特異性を示す Nudix タンパク質として発見された。その基質認識、及び触媒反応機構を明らかにするため、立体構造情報をもとに作製した変異型酵素の解析を行った。その結果、Ndx4 が基質中のアデニン、および末端のリボース構造を特異的に認識するための相互作用群を同定することができた。また触媒反応機構に関して、Nudix タンパク質が共有するモチーフ配列中のグルタミン酸残基が活性部位中で 2 つの金属イオンを配位しており、この金属イオンによって活性化された水分子が求核攻撃を起こす“two-metal-ion mechanism”が用いられていることが明らかになった。このような反応機構は他の Nudix タンパク質で提唱されたものと異なっており、Nudix タンパク質ファミリーが触媒モチーフを共有するにも関わらず、詳細な点では多様な触媒メカニズムを持つ、ということが示唆された。

Ndx8 はアミノ酸配列の相同性からヌクレオシド-二リン酸分解酵素であると予想されたが、その生理的な役割は不明であった。ndx8 遺伝子破壊株の表現型解析を行ったところ、栄養飢餓条件下において野生株よりも早い段階で定常期様の形態学的特徴が観察された。また、DNA マイクロアレイを用いた転写解析の結果からは、翻訳装置や細胞増殖に必須な代謝物の生合成経路の抑制が確認された。質量分析計を用いた細胞内低分子のプロファイリング解析を行ったところ、ndx8 遺伝子破壊株の細胞に、細菌の栄養枯渇応答シグナルである ppGpp が過剰に蓄積していること

を発見した。*In vitro*での活性を調べたところ、Ndx8がppGppに対して高い分解活性を持つことを確認することが出来た。今回得られた結果は、Ndx8の生理的な基質がppGppであり、その分解活性によって高度好熱菌の増殖期を制御するシステムが存在することを示唆している。

### 論文審査の結果の要旨

高温の温泉のような極限環境に生育する生物は、棲息するために最少限必要な遺伝子（タンパク質）の約2,000種類だけは維持するように進化してきたことが、ゲノム解析によって明らかされてきた。それら約2,000種類のほとんどは、基本的生命活動に必須であり、多くの生物に共通に保存されている。しかし、その1/3については、生物学的に極めて重要であるにもかかわらず、未だに機能が知られていない。それら機能未知タンパク質群の中で、不要代謝物質群を浄化するNdxタンパク質群8種類の中の2つについて、大賀拓史君は機能を解明した。その際に利用したモデル生物は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 である。

Ndx4については、ADP-riboseを分解除去する機能を備えており、触媒反応には金属イオンとその近傍に存在する数アミノ酸残基が関与することが明らかになった。また、Ndx8については、ppGppを分解することによって、細胞の環境適応を調節する重要な働きをしていることを発見した。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。