The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structural and functional analysis of RecJ-type exonucleases
Author(s)	若松, 泰介
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/49329
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【109】

氏　　名	若　松　泰　介（わか まつ たい すけ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２３１０４　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学　位　論　文　名	Structural and functional analysis of RecJ-type exonucleases （RecJ 型エキソヌクレアーゼの構造機能解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　倉光　成紀 （副査） 教　授　河村　　悟　　教　授　小倉　明彦　　教　授　谷澤　克行

論　文　内　容　の　要　旨

DNA の損傷は細胞死、細胞老化、癌化をもたらし、様々な病気を引き起こすが、生物は種々の DNA 修復酵素群を備えている。原核生物で高度に保存された RecJ は DNA 修復や相同組換えの際に働く

一本鎖 DNA 特異的な 5'-3' エキソヌクレアーゼであり、その特徴的なアミノ酸配列モチーフ (DHH モチーフ I- IV, DHHA1 モチーフ) より、RecJ-like ファミリー I タンパク質に分類されている。この RecJ について以前に、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 RecJ (ttRecJ) のこれらモチーフを含むコアドメインの X 線結晶構造 (40-463 残基領域) が決定されている (Yamagata *et al*. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 5908-5912) が、全長の立体構造は報告されておらず、その機能についても不明な点が多かった。本研究ではまず、ttRecJ 全長 (666 残基) の X 線結晶構造解析を行った。SPring-8にて回折データを取得し、コアドメインを用いた分子置換法により位相を決定した。その結果、単独構造だけではなく、活性発現に必須な Mg^{2+}、または Mn^{2+} との複合体構造を明らかにすることができた。金属イオンが結合した活性部位の孔径は約 11 Å であり一本鎖核酸に適した構造であった。コアドメイン構造と比べると DHHA1 モチーフがより活性部位を閉じていることが明らかになった。また、一次配列情報からでは解からなかったが、457-532 残基領域は oligonucleotide/oligosaccharide-binding (OB) フォールドを形成し、このドメインは DNA に特異的に結合することがゲルシフトアッセイの結果から示唆された。さらに、ttRecJ は *T. thermophilus* HB8 由来一本鎖 DNA 結合タンパク質 (ttSSB) と直接相互作用することが等温滴定カロリメトリーの結果から示唆され、ttSSB 存在下でエキソヌクレアーゼ活性が増加することも明らかになった。

また、原核生物には RecJ と同じ RecJ-like ファミリー I に属するタンパク質が他にも多く存在し, poly(A) polymerase のように機能が知られているものもある。しかし、それら以外の多くのものについては生理学的な働きはほとんど分かっていない。そこで本研究では、機能未知の RecJ-like ファミリー I 様タンパク質の機能解析も行った。まず *T. thermophilus* HB8 由来 TTHA0118 の活性測定を行った。TTHA0118 は RecJ と同じく金属イオン存在下で 5'-3' エキソヌクレアーゼ活性を持つが、短い一本鎖 DNA や一本鎖 RNA に対してより高い活性を示した。また、硫酸・システイン合成酵素、ヌクレオシド二リン酸キナーゼ、リボヌクレアーゼ等多くの酵素の阻害剤である pAp に対しても高いホスファターゼ活性を示した。TTHA0118 の遺伝子破壊株は最少必須培地での生育速度が低下し、DNA マイクロアレイを用いた解析によりストレスを受けていることが示唆された。しかし、モノヌクレオチド混合物 (AMP-GMP-CMP-UMP) やシステインの添加により生育速度を回復した。また、核酸前躯体を新規合成できない肺炎マイコプラズマ *Mycoplasma pneumoniae* 由来のホモログタンパク質 Mpn140 も、短い一本鎖核酸、pAp に対して高い分解活性を示した。これらの結果から、この機能未知とされていた RecJ-like ファミリー I タンパク質は生体内で短い一本鎖核酸ならびに pAp を基質としており、ヌクレオチド生合成のサルベージ経路と pAp の濃度調整に関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

5' から 3' の方向へポリヌクレオチドを加水分解する 5'-3' エキソヌクレアーゼは、DNA修復や相同組換えに重要な役割を果たす。その中の、おもな２種類の酵素（RecJ 蛋白質と TTHA0118）について、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来の蛋白質群を利用して、構造機能解析を行った。

RecJ 蛋白質については、全長蛋白質の立体構造解析に成功するとともに、活性測定も行った。その結果から、RecJ 蛋白質が３つのドメインから成ることが明らかになり、一本鎖 DNA に対する高い基質特異性も説明できた。一方、RecJ とアミノ酸配列が相同な機能未知蛋白質（TTHA0118）の基質特異性を調べたところ、短い一本鎖 DNA や RNA に対して高い活性を示すほか、低分子ヌクレオチドの pAp に対しても加水分解活性を示すことを発見した。以上のように、若松泰介君は、二種類の 5'-3' エキソヌクレアーゼにについて重要な発見を行っており、博士（理学）の学位に値する。