

Title	Role of the N-terminal domains for activities and stabilities of RNases H from hyperthermophilic bacteria
Author(s)	Jongruja, Nujarin
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59924
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

【10】

氏名	ジョルジュ・ヌジャリン Jongruja Nujarin
博士の専攻分野の名称	博士（工学）
学位記番号	第 25624 号
学位授与年月日	平成 24 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学位論文名	Role of the N-terminal domains for activities and stabilities of RNases H from hyperthermophilic bacteria (超好熱細菌由来リボヌクレアーゼ H の活性と安定性に及ぼす N 末端ドメインの役割)
論文審査委員	(主査) 教授 金谷 茂則 (副査) 教授 福井 希一 教授 原島 俊 教授 紀ノ岡 正博 教授 福崎 英一郎 教授 大竹 久夫 教授 渡邊 肇 教授 村中 俊哉 教授 仁平 卓也 教授 藤山 和仁 教授 永井 健治

論文内容の要旨

Ribonucleases H (RNase H) from *Aquifex aeolicus* (Aae-RNase H3) and *Thermotoga maritima* (Tma-RNase H1) contain a TATA-box binding protein (TBP)-like domain and hybrid-binding domain (HBD) at their N-termini, respectively. To analyze the role of these domains, the crystal structure of the protein was determined and the structure-based mutational studies were performed for Aae-RNase H3, and the mutational studies were performed for Tma-RNase H1. The crystal structure of Aae-RNase H3 was similar to that of *Bacillus stearothermophilus* RNase H3 (Bst-RNase H3), which is the only structure available for RNase H3, except that the arrangement of the N-terminal TBP-like domain relative to the C-terminal RNase H domain is different from that of Bst-RNase H3, the linker between these domains is shorter and less flexible than that of Bst-RNase H3, and the C-terminal RNase H domain contains three disulfide bonds. In addition, the non-conserved Glu194 was identified as the fourth active-site residue of Aae-RNase H3. Biochemical characterizations of Aae-RNase H3 and its derivatives without the N- or C-terminal domain indicate that the TBP-like domain is not important for Mn^{2+} -dependent activity and cleavage-site specificity, but is important for Mg^{2+} -dependent activity, substrate binding, and stability. Likewise, biochemical characterizations of Tma-RNase H1 and its derivatives without the N- or C-terminal domain indicate that HBD is not important for Mn^{2+} -dependent activity, cleavage-site specificity, and stability, but is important for Mg^{2+} -dependent activity and substrate binding. Based on these results, we discuss the substrate binding mechanism of these RNases H.

論文審査の結果の要旨

本論文は、超好熱細菌 *Aquifex aeolicus* 由来 RNase H3 (Aae-RNase H3) の結晶構造と N 末端の TATA-box binding protein-like domain (TBP 様ドメイン) の役割、および超好熱細菌 *Thermotoga maritima* 由来 RNase H1 (Tma-RNase H1) の N 末端の hybrid-binding domain (HB ドメイン) の役割について研究したものであり、以下に示すように、序論、本論 3 章、および総括から構成されている。第一章 (序論) では、RNase H の分類、生理機能、構造、触媒機構などに関するこれまでの研究をまとめると共に、中等度好熱細菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来 RNase H3 (Bst-RNase H3) や真核生物由来 RNase H1 の構造と機能に関してこれまで行われてきた研究の背景に触れ、本研究の目的と意義を述べている。第二章では、Aae-RNase H3 の結晶構造を決定することにより、Aae-RNase H3 は Bst-RNase H3 同様 TBP 様ドメインと RNase H ドメインから成ること、各ドメインの構造は Bst-RNase H3 と良く似ていること、Aae-RNase H3 のドメイン間のリンカーは Bst-RNase H3 より短く柔軟性に欠けるため、そのドメインの配置は Bst-RNase H3 とは大きく異なること、一次構造的に保存されていない Glu194 が DEDE 活性中心モチーフの 4 番目の活性中心残基であること、RNase H ドメインは 3 つのジスルフィド結合を有すること、を明らかにしている。第三章では、Aae-RNase H3 の N 末端ドメインあるいは C 末端ドメインを削除した変異体を構築し、酵素活性、基質結合能、安定性を測定することにより、Aae-RNase H3 の N 末端の TBP 様ドメインは Mn^{2+} 存在下における酵素活性や基質の切断部位特異性には重要ではないが、 Mg^{2+} 存在下における酵素活性、基質結合、安定性には重要であることを明らかにしている。また、ジスルフィド結合は安定性に大きく寄与することを明らかにしている。さらに、これらの結果に基づき Aae-RNase H3 の新たな基質認識機構を提案している。第四章では、Tma-RNase H1 の N 末端ドメインあるいは C 末端ドメインを削除した変異体を構築し、酵素活性、基質結合能、および安定性を測定することにより、Tma-RNase H1 の N 末端の HB ドメインは Mn^{2+} 存在下における酵素活性、基質の切断部位特異性、安定性には重要ではないが、 Mg^{2+} 存在下における酵素活性や基質結合には重要であることを明らかにしている。第五章 (総括) では、本研究で得られた結果に基づき TBP 様ドメインや HB ドメインの役割、さらにはこれらのドメインの付与による RNase H の分子進化について考察するとともに、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文は RNase H3 や RNase H1 の N 末端に存在する TBP 様ドメインや HB ドメインの役割に関して構造生物学的な観点から新たな知見を見いだした点で意義深い。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。