OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Structure and function of a Lon protease-like domain of a bacterial RecA paralog, RadA
Author(s)	井上, 真男
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/67052
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　井上　真男　）	
論文題名	Structure and function of a Lon protease-like domain of a bacterial RecA paralog, RadA (RecA パラログタンパク質 RadA が持つ Lon プロテアーゼ様ドメインの構造と機能)

論文内容の要旨

<背景と目的>

DNA 相同組換えは, DNA 二重鎖切断修復などを介して遺伝情報の維持に寄与する重要な生命現象である。RecA/Rad51 タンパク質は DNA 相同組換えの中心的役割を担っており, 相同 DNA 鎖の探索と鎖交換反応を触媒するリコンビナーゼとして働く。興味深いことに, 多くの生物種にはリコンビナーゼ以外に RecA/Rad51 に似た RecA/Rad51 パラログタンパク質が 1 つ以上存在し, DNA 相同組換えの補助因子として働くことが知られている。RadA はバクテリアに広く保存された RecA パラログタンパク質で, RecA と同様に DNA 存在下で ATPase 活性が活性化され, RecA による鎖交換反応を促進することで DNA 修復に関与すると考えられている。しかし, 立体構造は未解明であり, DNA 結合部位なども明らかになっていない。RadA は, RecA 様 ATPase ドメインの他にジンクフィンガードメイン (ZF) と Lon プロテアーゼ様ドメイン (LonC) を持つことが特徴であるが, LonC には活性残基の Ser が保存されておらず, プロテアーゼ活性は持たない。大腸菌などにおける遺伝学的な解析により, LonC が RadA を介した DNA 修復に必須であることが分かっているが, LonC の機能は未解明のままであった。そこで本研究では, RadA の LonC について構造機能解析を行った。

<結果と考察>

RadA のドメイン欠失変異体を作製し, それらの DNA 結合能を解析したところ, LonC が DNA 結合を担うことが明らかになった。プロテアーゼ型 LonC は DNA 結合能を持たないことから, RadA 型 LonC が何故 DNA 結合能を持つのかを調べるために, RadA 型 LonC の X 線結晶構造を分子置換法によって 2.7 Å 分解能で決定した。RadA 型 LonC はプロテアーゼ型 LonC と似たフォールドをしており, 6 量体リング構造を形成している点も共通であった。一方で, プロテアーゼ型 LonC とは異なり, RadA 型 LonC には正電荷に富んだ特徴的な領域が複数存在することが明らかになった。これらの領域が DNA 結合を担う可能性を検証するために, 塩基性アミノ酸残基を Ala に置換した部位特異的変異体の DNA 結合能を解析した結果, Arg286, Arg305, Arg314, Lys345, Arg385 が DNA 結合に関与することが示唆された。これらのアミノ酸残基は進化的に高度に保存されており, Arg286, Arg385 は 6 量体リング片面のサブユニット界面の凹みに, Arg305, Arg314, Lys345 は 6 量体リングの穴の内壁に位置していた。R286A/R385A および R305A/R314A/K345A 変異体は単一変異体に比べて DNA 結合能が低下したことから, これら 2 つの領域が DNA 結合部位として機能することが分かった。

次に, 同定した 2 つの DNA 結合部位が RadA の DNA 修復活性に与える影響を解明するために, *radA* 遺伝子欠損株を用いた解析を行った。R286A/R385A および R305A/R314A/K345A 変異体では, 野生型 RadA とは異なり, *radA* 遺伝子欠損株の DNA 傷害に対する感受性を相補することができなかった。このことから 2 つの DNA 結合部位が RadA による DNA 修復に必須であることが明らかになった。さらに, 2 つの DNA 結合部位が ATPase 活性にどのような影響を与えるのかを解析したところ, R286A/R385A 変異体では, 野生型や R305A/R314A/K345A 変異体とは異なり, DNA による ATPase 活性の活性化が見られなかった。面白いことに, R286A/R385A 変異体は DNA 非存在下においても DNA によって活性化された野生型と同程度の ATPase 活性を示したことから, Arg286 および Arg385 が ATPase 活性の制御に関わることが示唆された。以上の結果から, RadA は LonC の 2 つの異なる領域を介して DNA と結合し, ATPase ドメインと協調して DNA 修復に関与することが明らかになった。

発表論文

<主論文>

Inoue, M., Fukui, K., Fujii, Y., Nakagawa, N., Yano, T., Kuramitsu, S., and Masui, R. (2017) The Lon protease-like domain in the bacterial RecA paralog RadA is required for DNA binding and repair. *J. Biol. Chem.*, in press.

<参考論文>

Masui, R., Takahata, Y., Inoue, M., Iio, Y., Okanishi, H., Kim, K., Nakagawa, N., Yura, K., and Kuramitsu, S. (2014) Structural insights of post-translational modification sites in the proteome of *Thermus thermophiles*. *J. Struct. Funct. Genomics*, **15**, 137–151

Takahata, Y., Inoue, M., Kim, K., Iio, Y., Miyamoto, M., Masui, R., Ishihama, Y., and Kuramitsu, S. (2012) Close proximity of phosphorylation sites to ligand in the phosphoproteome of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Proteomics* **12**, 1414–1430

Morita, R., Nakane, S., Shimada, A., Inoue, M., Iino, H, Wakamatsu, T., Fukui, K., Nakagawa, N., Masui, R., and Kuramitsu, S. (2010) Molecular Mechanisms of the Whole DNA Repair System: A Comparison of Bacterial and Eukaryotic Systems. *J. Nucleic Acids* **2010**, 179594 (review)

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　井上　真男　）

	（職）	氏　名
論文審査担当者	主査　教授	松野　健治
	副査　教授	升方　久夫
	副査　教授	栗栖　源嗣
	副査　教授（大阪市立大学）	増井　良治

論文審査の結果の要旨

DNA 相同組換え反応は、様々の DNA 損傷、特に DNA 二重鎖切断の修復反応に重要であり、生物種を通じて広く保存されているしくみである。DNA 相同組換え反応では、原核生物、真核生物、古細菌を通じて RecA/Rad51 タンパク質が DNA 相同鎖検索と相同鎖結合段階で必須の役割を果たす。バクテリアの RecA パラログタンパク質である RadA は、DNA 相同組換えにおいて RecA による鎖交換反応を促進する補助的因子として働くことが知られている。真核生物や古細菌とは異なり、バクテリアの RadA タンパク質はタンパク質分解酵素 Lon プロテアーゼの活性ドメインに類似した配列を C 末端領域に持つ。この Lon プロテアーゼ様ドメインは相同組換えに必要であるがプロテアーゼ活性を示さず、その機能は不明であった。

申請者は、*Thermus thermophilus* RadA の DNA 結合活性が Lon プロテアーゼ様ドメインに由来することを見出した。また、RadA 型 Lon プロテアーゼ様ドメインの X 線結晶構造を決定し、このドメインがリング状六量体構造をとり、表面に 2 つの顕著な正電荷領域をもつことを見いだした。これら 2 箇所の正電荷領域が DNA 結合に重要であり、RadA の DNA 依存的な ATPase において異なる機能を持つことも明らかにした。さらに、遺伝学的な解析によって、紫外線による DNA 損傷の修復にこれらの DNA 結合部位が必須であることを明らかにした。

RadA に共通するプロテアーゼ様ドメインがタンパク質分解機能ではなく DNA 結合能を介して DNA 組換え修復に寄与することを構造と機能解析から解明した成果は、相同組換え機構における RadA の役割を理解する上で重要である。また、プロテアーゼ様ドメインが DNA 結合活性を担うという新たな発見は、タンパク質の進化の観点からも大変興味深いものである。

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。