



Title	Analysis of a Metallo-protein, Ribonuclease HI by Native Mass Spectrometry
Author(s)	安東, 友繁
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69338
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (安 東 友 繁)	
論文題名	Analysis of a Metallo-protein, Ribonuclease HI by Native Mass Spectrometry (ネイティブマスマススペクトロメトリーによる金属タンパク質リボヌクレアーゼHIの分析)
論文内容の要旨	
リボヌクレアーゼHI (RNase HI)は、RNA/DNA二重鎖のRNA鎖のリン酸ジエステル結合を加水分解し、5'-リン酸末端と3'-ヒドロキシ末端を生成するエンドリボヌクレアーゼである。RNase HIの詳細な酵素反応に関して1個あるいは2個、二価金属イオン (Mg^{2+}、Mn^{2+}) が関与する酵素反応機構が提唱されていた。しかし、二価金属イオンと基質であるRNA/DNA二重鎖からなる複合体は天然型RNase HIでは酵素反応が進行するために共結晶構造を得ることが困難であり、活性部位の変異による変異型RNase HIが用いられている。これら変異型RNase HIは、二価金属イオンと直接関与する活性部位アミノ酸の改変を伴っているため、天然型との差異が問題となってきた。そこで、本研究では、<i>Escherichia coli</i>由来の天然型RNase HIと基質RNA/DNA二重鎖を種々の二価金属イオン存在下でネイティブマスマススペクトロメトリー (native MS) を用いて測定し、酵素活性を有するRNase HI複合体の水溶液中での化学量論の解明を目標として行った。 基質RNA/DNA二重鎖の非存在下において、RNase HIはX線結晶構造解析から示されているような2個のMn^{2+}の特異的な結合は観測されず、濃度依存的な非特異的結合を示した。一方、基質存在下では、RNA/DNA二重鎖と共に2個のMn^{2+}イオンが特異的に結合し、酵素活性を有する天然型RNase HIと基質、二価金属イオンのMn^{2+} (2個) の三者複合体の観測に今回初めて成功した。 また、二価金属イオンである亜鉛イオンによる活性発現の報告があり、これについてもMn^{2+}と同様に測定し、複合体形成能と活性との関連を調べた。Mn^{2+}とは異なり、Zn^{2+}はRNase HIに対して特異的に1個結合し、さらに、基質存在下では、Mn^{2+}と同様、2個のZn^{2+}イオンを含む三者複合体を形成することがわかったが、観測された分子イオンピークを正確に解析してみると理論値よりも18 Da大きく観測されていた。これは加水分解されたRNA鎖が解離せずに複合体中に保持されて観測されたものと推定された。また、マンガンイオンと亜鉛イオンによる酵素活性を比較すると、亜鉛イオンは低濃度 (1 μM) においてマンガンイオンよりも約3倍活性が高いことが明らかとなった。これらの結果から、細胞内でRNase HIの酵素反応には亜鉛イオンが関与している可能性があることが示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (安東 友繁)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	高尾 敏文
	副 査	教授	深瀬 浩一
	副 査	教授	北條 裕信

論文審査の結果の要旨

タンパク質とリガンドや金属イオンといった他の物質との相互作用を解析する場合、一般にこれらの複合体の結晶構造解析、NMR 等の機器分析手段が用いられる。しかし、相互作用があまり強くない、あるいは複合体が一過的で短寿命である場合には、これらの手法で解析することは困難である。本論文では、このような相互作用の例として、未だ報告がなされていないリボヌクレアーゼ H Type-I (RNase HI)、RNA/DNA ハイブリッド、 Mn^{2+} の3者複合体の水溶液中での相互作用を検出することを目的とし、タンパク質をネイティブ状態で測定することができる質量分析法 (Native-MS) を利用して解析を行っている。RNase HI は RNA/DNA ハイブリッド鎖の RNA 鎖を特異的に加水分解する酵素で、様々な生物種やエイズウイルスの鍵酵素として知られ、その構造と機能については多くの研究が行われてきた。その活性発現には Mg^{2+} や Mn^{2+} のような 2 価金属イオンが必須であるとされている。RNase HI の X 線結晶構造解析はすでに行われているが、活性型に 2 価イオンが結合した RNase HI では、基質の加水分解が直ちに進むため、活性部位周辺のアミノ酸を変異した不活性型を用いた複合体解析にとどまっている。このような不安定な複合体の解析は、実際の水溶液中での化学量論を知る上で重要であり、また、構造活性相関を明らかにする上で必要不可欠と考えられる。

本論文では、活性型の RNase HI 複合体の検出を Native-MS を用いて行い、主に、質量分析計のイオン源における種々の電圧設定等を調整することにより、RNase HI、RNA/DNA、 Mn^{2+} の3者複合体の検出に初めて成功している。さらに、他の類似酵素で報告のある Zn^{2+} についても同様の解析を行い、 Zn^{2+} が Mn^{2+} と同様に機能すること、 Zn^{2+} は Mn^{2+} よりも酵素との親和性が高いこと、また、 Mn イオンに比べ比較的高い活性を示すが、エイズウイルスの鍵酵素と同様に高濃度領域においては活性が減弱することなどを明らかにした。この結果と大腸菌細胞内の Zn^{2+} イオンの実効濃度を考えると、新生の RNase HI は Zn^{2+} イオンと結合しているのではないかという可能性が示唆された。

以上のように、本論文は、Native-MS により酵素反応の加水分解過程をモニターリングできることを示し、短時間内で変化する複合体解析に有用であることを実証しており、これまで見出されていない複合体の検出に威力を発揮するものと思われる。

上記の成果は、RNase HI の酵素機能に関する新たな知見をもたらすとともに、他の手法では検出が困難な複雑な複合体解析に応用できる可能性を示しており、高く評価できる。

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。