

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (エネルギー科学)	氏名	万里 (Wan Li)
論文題目	Insights into the length- and location-dependent deaminase activities of APOBEC3B/F and the deaminase activity determinants of APOBEC3F (APOBEC3B/F の長さ と位置依存的な脱アミノ化活性と APOBEC3F の脱アミノ化活性決定因子に対する洞察)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、DNA のシトシン塩基を脱アミノ化してウラシル塩基に変換する事で遺伝情報の改変を行う酵素である APOBEC3B (A3B) タンパク質と APOBEC3F (A3F) タンパク質に関し、標的 DNA の鎖長及び鎖中における位置と活性の関係、さらに活性発現に関与するアミノ酸残基の役割を解析し、これらの酵素の動作機構を解明した結果をまとめたもので、6章からなっている。</p> <p>第1章は序論で、バイオエネルギーの生成・利活用一般における酵素の重要性をまず述べている。次に A3B と A3F が APOBEC3 (A3) タンパク質ファミリーに属し、同ファミリーに属するタンパク質は DNA のシトシン塩基を脱アミノ化する事で遺伝情報を改変し、様々な生物学的な作用を発揮する事を説明している。これまでに同ファミリーに属するタンパク質に関して得られている酵素活性及び立体構造に関する知見を述べた上で、今回扱う A3B と A3F に関しては、その生物学的な活性の重要性が認知されているのにもかかわらず、酵素としての特性と活性残基の役割に関する知見が乏しい事を指摘している。そこでリアルタイム NMR 法と生化学的方法を用いてこれらの点を解析し、二つのタンパク質の動作機構を解明するという本論文の目的を述べている。</p> <p>第2章では、リアルタイム NMR 法と生化学的方法によって、A3B による脱アミノ化反応を追跡できる事をまず示している。両手法によって、A3B は長い DNA 鎖中よりも短い DNA 鎖中に存在する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事を見出した。また DNA 鎖中のより中央部に位置する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事も見出した。これらの特性は、A3 タンパク質ファミリー属し研究が最も進展している APOBEC3G (A3G) とは、全く異なるものである事を指摘している。A3B の DNA 鎖への結合、その後の DNA 鎖上のスライディングによる標的シトシンの探索、及び DNA 鎖からの解離による探索の終了を考慮する事で、上記の特性を合理的に説明するモデルを構築する事に成功した。</p> <p>第3章では、A3F が効率的に脱アミノ化を行うシトシン含有 DNA 塩基配列を決定した。また同タンパク質の変異体を網羅的に多数調製し、これらに関する脱アミノ化活性の解析を行う事で、基質 DNA 鎖との結合を担うアミノ酸残基と触媒活性を担うアミノ酸残基を各々同定する事に成功した。また pH の変化が活性に及ぼす影響の解析を通して、天然型より活性が格段に高い変異体を獲得する事に成功した。</p> <p>第4章では、A3F の脱アミノ化反応に関し、標的シトシンを含む DNA 鎖の濃度が低い時には、短い DNA 鎖中よりも長い DNA 鎖中に存在する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事を見出した。一方標的シトシンを含む DNA 鎖の濃度が高い時には、</p>			

長い DNA 鎖中よりも短い DNA 中鎖に存在する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事を見出した。DNA の鎖長に依存して酵素活性が変わる事は、A3 タンパク質ファミリーの他のタンパク質においても見られるが、この鎖長依存性が DNA 濃度によって変化する事が今回初めて見出された。DNA 鎖の濃度に依存して A3F の DNA 鎖への結合割合が変化する事を考慮した上で、結合後の A3F の DNA 上のスライディングと解離を考える事で、上記の特性を合理的に説明するモデルを構築する事に成功した。

第 5 章では、A3 タンパク質群をユビキチン化する事で分解に導き不活性化する事が知られている Vif タンパク質に関し、A3F による脱アミノ化反応への影響を解析した結果が示されている。Vif は、A3F と直接相互作用する事で脱アミノ化反応を阻害する活性を有する事が見出された。

第 6 章は総括で、A3B と A3F に関して、リアルタイム NMR 法と生化学的方法によって、酵素としての特性と活性残基の役割を解析する事で、これらのタンパク質酵素の動作機構の解明に関して得られた成果を要約している。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

バイオマスの利活用において酵素タンパク質は重要な役割を果たし、酵素の動作原理の理解は、バイオマスの効率的な利活用法の開発に資する。本論文は、DNAのシトシン塩基を脱アミノ化してウラシル塩基に変換する事で遺伝情報の改変を行う酵素である APOBEC3 (A3) ファミリーの APOBEC3B (A3B) タンパク質と APOBEC3F (A3F) タンパク質に関し、酵素としての特性と活性残基の役割をリアルタイム NMR 法と生化学的方法によって解析する事で、これらのタンパク質酵素の動作機構を解明した結果をまとめたもので、得られた主な成果は次のとおりである。

1. A3B は長い DNA 鎖中よりも短い DNA 鎖中に存在する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事を見出した。また DNA 鎖中のより中央部に位置する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事も見出した。これらの特性は、A3 ファミリー属する APOBEC3G (A3G) タンパク質とは、全く異なるものであった。A3B の DNA 鎖への結合、その後の DNA 鎖上のスライディングによる標的シトシンの探索、及び DNA 鎖からの解離による探索の終了を考慮する事で、上記の特性を合理的に説明できる事が示された。
2. A3F の変異体を網羅的に調製し、これらに関する脱アミノ化活性の解析を行う事で、基質 DNA 鎖との結合を担うアミノ酸残基と触媒活性を担うアミノ酸残基が、各々同定された。
3. A3F の脱アミノ化反応に関し、標的シトシンを含む DNA 鎖の濃度が低い時には、短い DNA 鎖中よりも長い DNA 鎖中に存在する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事が示された。一方標的シトシンを含む DNA 鎖の濃度が高い時には、長い DNA 鎖中よりも短い DNA 鎖中に存在する標的シトシンを、効率的に脱アミノ化する事が示された。活性の鎖長依存性が DNA 濃度によって変化する事は、他の A3 ファミリーのタンパク質においては報告されておらず、A3F において今回初めて示された。DNA 鎖の濃度に依存して A3F の DNA 鎖への結合割合が変化する事を考慮した上で、その後の A3F の DNA 上のスライディングと解離を考える事で、上記の特性を合理的に説明できる事が示された。
4. A3 タンパク質群をユビキチン化する事で分解に導き不活性化する事が知られている Vif タンパク質に関し、A3F と直接相互作用する事で脱アミノ化反応を阻害する活性を有する事が示された。

以上本論文では、A3B と A3F の特性と活性残基の役割を明らかにし、これらの酵素の動作機構を解明した。得られた知見は、バイオマスの利活用における酵素タンパク質の動作機構を理解する為の基盤となり、エネルギー科学の研究に寄与するところ大である。よって、本論文は博士 (エネルギー科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 29 年 10 月 24 日実施した論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文の全文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 2018年11月28日以降