

氏 名	なか たに まさる 中 谷 勝
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2292 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Studies on a thermostable DNA ligase from a hyperthermophilic archaeon (超好熱始原菌由来の耐熱性 DNA リガーゼに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 中 忠 行 教 授 青 山 安 宏 教 授 木 村 俊 作

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、DNA 代謝（DNA 複製・修復・組換え）における必須酵素である DNA リガーゼを、始原菌由来のものとして初めて解析し、その酵素の特徴をまとめたものであり、序論、本論 4 章、結論から構成されている。

序論では、DNA リガーゼの歴史的背景、第 3 の生物群「始原菌」における DNA 代謝研究の現状、ならびに DNA リガーゼの反応メカニズムや研究の現状などがまとめられている。

第 1 章は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来 DNA リガーゼ (*Tk*-Lig) の遺伝子クローニング及びその生化学的特徴についてまとめたものである。*Tk*-Lig 遺伝子は 1686bp, 562 アミノ酸をコードしており、以前に報告されている DNA リガーゼとの比較や、ATP 依存型あるいは NAD^+ 依存型におけるそれぞれの保存配列に対する比較などから、ATP 依存型 DNA リガーゼと推測された。組換え型 *Tk*-Lig の生化学的な解析を行い、ATP の存在下で高い活性を示すことを実験的に明らかにした。また、*Tk*-Lig が高い耐熱性を有し、 100°C においてもリガーゼ活性を示すことを明らかにした。これらは、始原菌 DNA リガーゼの最初の解析例であると共に、初めての耐熱性 ATP 依存型リガーゼの報告でもある。

第 2 章では、*Tk*-Lig と基質 DNA との関係、そして金属イオン要求性についての解析結果がまとめられている。*Tk*-Lig は反応に 2 価金属イオンを要求し、 Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Ca^{2+} の利用が可能であった。基質の認識に関しては、酵素の DNA 認識の前に 2 本鎖 nicked DNA の形成が必要であることを明らかにした。また、nick 部位が連結された後は速やかに DNA から離れることも見いだした。Nick 部位において DNA がミスマッチやオーバーラップしている基質を用いた解析から、*Tk*-Lig は nick 部位の 3'-OH 側を厳密に認識する一方、5'-リン酸基側については認識が緩いことを明らかにした。

第 3 章では、*Tk*-Lig の補因子依存性について検討が行われている。様々な補因子を調べた結果、*Tk*-Lig による AMP 依存型の活性を発見した。*Tk*-Lig における AMP 結合部位のアミノ酸を置換した K252A 変異体酵素を用いた解析から、AMP 依存型の反応は ATP 依存型とよく似た機構に従っていることが示唆された。このことは、ATP 依存型機構で見られる反応中間体を AMP 存在下で調べ、全ての中間体を検出することにより裏付けられた。一方、*Tk*-Lig は ATP 存在下では $30\sim 100^\circ\text{C}$ の範囲で活性を示すのに対し、AMP 存在下では $65\sim 85^\circ\text{C}$ の範囲でのみ活性を示すことを明らかにした。

第 4 章は、*Tk*-Lig の AMP 依存型活性の反応機構を、熱力学的側面から検討した結果が述べられている。DNA の連結反応は常温では吸エルゴン反応であるが、基質と生成物に相当する DNA を熱力学的に解析した結果、エンタルピーの観点からは $56\sim 94^\circ\text{C}$ において基質—生成物間のエネルギー準位差が生成物の蓄積する方向に変化することが明らかとなった。エントロピーのファクターがそれを打ち消すことになるが、基質 DNA の解離変性温度 (T_m , 91°C) 以下ではその影響は小さいと考えられる。即ち $56\sim 91^\circ\text{C}$ においては、補因子由来のエネルギーに依存しない連結反応が、熱力学的に有り得ないわけではないと推測された。これは AMP 活性が $65\sim 85^\circ\text{C}$ の範囲でしか観察されない事実によく符合していた。この仮

説は、短鎖長の基質を用いた検証により裏付けられた。この AMP 依存型 DNA リガーゼ反応は、基質と生成物の相対的なエネルギー準位が反応温度によって変わることによって可能となる、従来例のない酵素反応の最初の報告である。

結論では、本論文で得られた成果について要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 を対象として、DNA 代謝（DNA 複製・修復・組換え）における必須酵素である DNA リガーゼに関する研究を行い、その成果についてまとめたものである。得られた主な成果は次の通りである。

1. 超好熱始原菌 *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来 DNA リガーゼ遺伝子の全塩基配列を明らかにし、始原菌 DNA リガーゼのアミノ酸配列上の特徴を明らかにした。

2. 組換え型酵素の大量発現、精製、ならびに生化学的解析を行い、始原菌 DNA リガーゼは ATP 依存型であることを実験的に明らかにした。

3. 本酵素が高い耐熱性を有していることを明らかにした。

4. 様々な基質 DNA に対する解析から、本酵素が、nick 部位の 3'-OH 側を厳密に認識する一方、5'-リン酸基側については認識が緩いことを明らかにした。

5. 補因子に対する特異性を検討したところ、本酵素が ATP 以外にも NAD^+ および AMP に依存した活性を有することを発見した。

6. 従来の反応機構からは説明のできない AMP 依存型の活性について、反応中間体の検出や変異体酵素を用いた生化学的解析により、その存在を確認した。

7. 基質 DNA に対する熱力学的解析結果に基づき、AMP 依存型活性を説明し得る新しい反応モデルを提案した。これは、基質と生成物の相対的なエネルギー準位が反応温度によって変わることにより可能となる、従来例のない酵素反応の最初の報告であった。

以上、本論文は始原菌由来のものとして初めて DNA リガーゼを解析したものであり、また、耐熱性 ATP 依存型 DNA リガーゼに対する最初の解析報告でもある。得られた成果は、耐熱性 DNA リガーゼの反応機構の解明のみならず、遺伝子工学技術への応用につながるものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成15年2月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。