

氏 名	こもりひろふみ 小森博文
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2475 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学位論文題目	Structral studies on DNA-binding proteins: DNA replication initiator and DNA photolyase (DNA 結合タンパク質の構造解析: DNA 複製開始タンパク質と DNA 光回 復酵素)
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 維 昭 教 授 三 木 邦 夫 助教授 樋 口 芳 樹

論 文 内 容 の 要 旨

複製や修復などの DNA の代謝には、様々な DNA 結合タンパク質が関与している。これらの DNA 結合タンパク質と DNA との特異的な相互作用は、その機能を理解する上で非常に重要である。本研究では、DNA 結合様式とその機能を明らかにするために、DNA 複製開始タンパク質と DNA 光回復酵素という二つの DNA 結合タンパク質の X 線構造解析を行った。

F プラスミドは大腸菌を宿主として複製し、大腸菌染色体あたり 1～2 コピーで安定に保持されている。その複製の制御機構は、他の生物に比べると極めて単純で、複製開始タンパク質 RepE の構造変換によって複製開始が調節されている。RepE は二つの機能を持ち、それらは単量体と二量体という構造の違いによっている。RepE 二量体は自己の遺伝子のオペレーターに結合し転写抑制因子として働き、一方、RepE 単量体は複製開始領域の繰り返し配列に結合し DNA の複製を開始する。RepE は通常二量体として存在し、二量体から単量体の変換には分子シャペロンが関与している。多くのプラスミドの複製開始タンパク質は非常に凝集しやすい共通の性質を持っているため、これまでに多くの複製開始タンパク質が精製されているにもかかわらず、それらの立体構造はまったく明らかになっていない。野生型 RepE もたいへん凝集しやすく結晶化が難しい。しかしながら、単量体として安定な点変異体 RepE54 (R118P) を用いて、さらに DNA との複合体として結晶化することによって、構造解析に適する良質な結晶を得ることに成功した。位相は多重同型置換法により決定し、特定部位にヨウ素を導入した DNA との共結晶を同型置換体として用いることによって迅速な構造解析を行うことができた。最終的には、分解能 2.6 Å で RepE54-DNA 複合体の立体構造を得た (結晶学的 R 値, Rfree 値は 21%, 27%)。

明らかになった結晶構造から、RepE54 は分子内 2 回対称によって関係づけられる、よく似た二つのドメイン (N 末, C 末ドメイン) から構成されることが分かった。それぞれのドメインがヘリックス—ターン—ヘリックスモチーフを持っており、その認識ヘリックスが DNA の大きな溝に入り込むことによって DNA と結合している。これらの結合様式は一見よく似ているが、C 末ドメインが DNA 塩基対と特異的に相互作用しており、DNA 結合の主要な役割を担っている。一方、N 末ドメインは非特異的な DNA 結合に加えて、二量体を形成する上で重要な働きをする。このように RepE は構造的によく似た二つのドメインが、それぞれ異なる機能を有することが示唆された。

遺伝情報の担い手である DNA は紫外線によって常に損傷を受けている。遺伝情報を保持するために、DNA の損傷を修復することは生物の生存にとって極めて重要である。DNA 光回復酵素は、可視光のエネルギーを利用して紫外線によって損傷した DNA (ピリミジンダイマー) を修復する。光回復酵素はその修復反応を担う触媒補欠分子 (FAD) の他に、可視光のエネルギーを吸収して FAD に伝達する集光性補欠分子を持っており、その種類によって異なる波長を吸収する二つのタイプ (葉酸タイプとデアザフラビンタイプ) に分類される。それぞれのタイプの光回復酵素 (大腸菌由来とらん藻由来) の立体構造は既に決定されており、酵素活性の効率の違いが集光性補欠分子の結合様式に依存していることが明らかになっている。しかし、基質であるピリミジンダイマーの認識機構については、その構造情報がまったくなく、その分子機構はよ

く分かっていない。好熱菌として初めて単離された高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 の光回復酵素は、熱安定性が高く機能解析に適しているが、その集光性補欠分子の化学種は明らかになっていない。この高度好熱菌の光回復酵素の特徴を明らかにする目的で X 線結晶解析を行った。さらに、基質認識機構を解明するために、基質の一部であるチミン塩基との複合体の結晶構造も決定した。

構造解析に用いた結晶は、空間群 $P6_122$ に属し、 $a=b=113\text{ \AA}$ 、 $c=142\text{ \AA}$ 、非対称単位中に一分子のタンパク質が存在している。重原子同型置換法によって位相を決定し、全アミノ酸420残基と触媒補欠分子 FAD 一分子を含むモデルを構築した（分解能 $2.1\text{ \AA}$ 、結晶学的 R 値、 R_{free} 値は 21.4% 、 25.1% ）。

全体構造は大腸菌およびらん藻由来のものとよく似ているが、ループ領域が短く、またプロリンが連続して存在しているなど、熱安定性に関係すると思われる特徴が見つかっている。集光性補欠分子の結合部位の比較からは、らん藻由来のものと同一デアザフラビンタイプである可能性が高いことが示唆された。複合体の結晶構造では、活性部位の FAD へつながる溝の中に、チミン塩基が一分子結合していた。この溝の周囲には正の電荷をもったアミノ酸残基が集中しており、DNA 結合に適している。この溝の中に DNA 二重鎖からフィリップアウトしたピリミジンダイマーが入ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、DNA 複製開始タンパク質と DNA 光回復酵素という二つの DNA 結合タンパク質の X 線結晶構造解析を行い、その立体構造からタンパク質-DNA 相互作用とその機能について分子レベルで議論したものである。

F プラスミドの複製開始タンパク質 RepE の単量体は、構造的によく似た二つのドメインを持っていることが明らかになった。これらは擬似二回対称の関係にあるが、これらのことは一次構造からはまったく予想されていなかった。それぞれのドメインがヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを持っており、その認識ヘリックスが DNA の大きな溝に入り込むことによって DNA と結合しており、一見同じような結合様式をしているが、C 末ドメインが DNA 塩基対と特異的に相互作用しており、DNA 結合の主要な役割を担っていることが明らかになった。一方、N 末ドメインは非特異的な DNA 結合に加えて、二量体を形成する上で重要な働きをすることも示された。変異体の解析及び単量体の構造を基にした二量体構造のモデリングから、RepE が二量体を形成するときに、N 末ドメインが大きな構造変化することが示唆された。

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の DNA 光回復酵素については、中温菌のものと比べて全体的に引き締まった構造をしていることが明らかになった。光エネルギーを吸収する集光性補欠分子については、その結合部位の構造からデアザフラビンが結合することが示唆された。さらに、基質の一部であるチミンとの複合体の結晶構造からは、DNA 二重鎖からフィリップアウトしたピリミジンダイマーを認識する機構を支持する結果を得た。チミンは分子表面から活性部位の FAD へつながる溝の中に結合していて、この溝の周囲には正の電荷をもったアミノ酸残基が集中しており、DNA リン酸骨格と相互作用するのに適していた。溝の中でチミンと相互作用しているトリプトファン残基は、本来の基質であるピリミジンダイマーを認識する上でも重要な働きをしていることが示唆された。

以上のように、DNA 複製開始タンパク質と DNA 光回復酵素の二つの DNA 結合タンパク質の構造解析を行うことによって、それらの特異的な DNA 認識機構と機能に関する詳細な知見を得ることに成功している。これらの研究成果は、当該分野の進展に確かな寄与があるものであり、本論文は博士（理学）の学位論文として充分価値のあるものと認められる。

なお、本論文に報告されている内容および、これに関連する分野について諮問した結果、合格と認めた。