

|           |                                                                                                                                                   |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | なか やま ひと し<br>中 山 仁 志                                                                                                                             |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (農 学)                                                                                                                                         |
| 学 位 記 番 号 | 農 博 第 1556 号                                                                                                                                      |
| 学位授与の日付   | 平成 18 年 3 月 23 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    | 農 学 研 究 科 応 用 生 物 科 学 専 攻                                                                                                                         |
| 学位論文題目    | Characterization and Structure Analysis of Archaeal Intron-encoded<br>Homing Endonucleases<br>(古細菌イントロンにコードされるホーミングエンドヌクレアーゼ群の性状<br>解析及び構造生物学的研究) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 左 子 芳 彦    教 授 平 田    孝    教 授 喜 多 恵 子                                                                                               |

### 論 文 内 容 の 要 旨

可動性イントロン内部にコードされるホーミングエンドヌクレアーゼ(HEase)は、可動性イントロンの水平伝播現象(ホーミング)を司る鍵酵素である。14-40塩基対の長い二本鎖 DNA を配列特異的に切断する HEase は、部位特異的な遺伝子組換えの起点を生物ゲノムに導入する際などに応用できる。その遺伝子組換え系において、HEase は特に高い効率で組換えを可能にしている一方、本酵素の高い配列特異性は、組換えを導入できる部位を大きく限定している。従って、その遺伝子組換え技術をより汎用性の高いものとするためには、新しい認識配列を切断できる HEase が多数必要である。これらの背景に基づいて本研究では、新しい認識配列を切断可能な HEase の同定・性状解析を行った。更には、HEase の認識配列改変系を構築するための基礎研究として、HEase の構造安定化原理や DNA 認識機構についての考察を行ったものである。

本論文は4つの章からなっている。第1章では、HEase の研究背景を記述している。第2章の1節では、超好熱古細菌 *Pyrobaculum oguniense* の 16S rDNA イントロンにコードされる HEase I-PogI の性状について論じている。I-PogI は触媒活性 LAGLIDADG モチーフを2コピー有するモノマー型 HEase であり、14bp の新しい認識配列を切断した。興味深いことに I-PogI は、I-PogI 遺伝子をコードする可動性イントロンの8塩基対上流に介在する、HEase 遺伝子をコードしないイントロン挿入部位周辺のエキソン配列を特異的に切断した。I-PogI のように隣のイントロン挿入部位周辺を切断する HEase については報告例が無く、本研究の成果は古細菌イントロン進化の考察について一石を投じるものであった。第2章の2節では、各地の温泉に由来する合計34株の *Thermoproteales* 目古細菌を対象に、その 23S rDNA から新規可動性イントロンを探索した結果について論じている。まず、PCR 法を応用した手法により、4株の *Thermoproteales* 目古細菌の 23S rDNA において、合計5箇所の新規イントロン挿入部位が存在することを明らかにした。これらのイントロン挿入部位には、HEase の ORF をコードする可動性イントロンが少なくとも1つずつ介在していた。次に、大腸菌の T7 発現系により、これらの ORF にコードされる遺伝子産物を発現させ、合計5種類の ORF が活性型 HEase をコードすることを *in vitro* で確認した。これらの HEase はそれぞれ独自の 16-22 bp の認識配列を切断し、いずれの認識配列も新規であった。第2章で記述した合計6種類の HEase は、生物ゲノムの新しい箇所に組換えを導入する酵素としての応用が見込めるものであった。

第3章では、新規 HEase I-Tsp061I の結晶構造を 2.1Å 分解能で精査して、明らかにした LAGLIDADG ファミリーの構造安定化原理について論じている。超好熱菌 *Thermoproteus* sp. IC-061 株の 16S rDNA イントロンにコードされる I-Tsp061I は、I-PogI と同じ対象配列を切断するイソシゾマーである。I-Tsp061I は、85-90°C の温度条件下で高い活性を示し、既知の HEase の中で最も高い熱安定性を有することから、HEase の構造安定化原理を研究する材料として適していた。I-Tsp061I は、 $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  フォールドを有するドメインが偽対称に2回繰返された構造を有しており、多数の塩橋ネットワーク、プロリン残基に富むドメイン・リンカー領域、活性中心周辺の大きな水素結合ネットワークを有する点で特徴的であった。他の LAGLIDADG 型 HEase との比較や I-Tsp061I における変異導入実験の結果から、I-Tsp061I に特徴的で

あった構造要素がその熱安定性に大きく寄与することが証明された。

第4章では、互いにイソシゾマーである I-Tsp061I と I-PogI の比較研究の結果に基づいて、HEase の DNA 認識機構について論じている。I-Tsp061I と I-PogI は互いに高いアミノ酸配列一致性 (71%) を示すにも関わらず、I-Tsp061I は I-PogI よりも13倍低い比活性を示し、より厳密な基質認識を示した。両者の性状における相違をもたらしたアミノ酸を同定するため、モデリングにより I-Tsp061I/DNA 複合体モデルを作成した。そのモデルの DNA 結合表面に位置するアミノ酸で、I-PogI のアミノ酸と異なる5残基 (Glu20・Ser48・Gly55・Ser151・Ser156残基) を選別した。I-Tsp061I において、これらの5残基を対象として変異導入実験を行った結果、幾つかの多重変異酵素が野生型 I-Tsp061I の8.5-24倍高い比活性を示した。また、これら5残基をすべて I-PogI 型に置換した五重変異酵素は、I-PogI とほぼ同じ比活性を示した。これらの一連の変異導入実験の結果から、DNA 結合面に位置するアミノ酸残基は、互いに影響を及ぼしつつ、酵素/DNA 相互作用に関与していることが示唆された。一方、比活性が一定以上に上昇した変異酵素は、I-PogI と同様に基質 DNA を寛容に認識した。この事実は、HEase がその比活性を低く抑えることで、厳密な基質認識能力を保っていることを示唆するものであった。

### 論文審査の結果の要旨

長い二本鎖 DNA を配列特異的に切断するホーミングエンドヌクレアーゼ (HEase) は、部位特異的な遺伝子組換えの起点を生物ゲノムに導入する際に応用できる。HEase は、その遺伝子組換えの導入効率を非常に高いものにしているが、その一方で本酵素の高い配列特異性は、組換えを導入できる部位を著しく限定している。本論文は、HEase を用いた遺伝子組換え系の汎用性を高めることを目的として、新しい認識配列を切断できる HEase を複数同定し、その機能解析を行ったものである。また、HEase の認識配列改変系を構築するための基礎研究として、HEase の構造安定化原理や DNA 認識機構についての検討も行っている。

本論文で評価すべき主要な点は以下の通りである。

1. *Thermoproteales* 目に属する超好熱古細菌34株の rRNA 遺伝子座を対象に、PCR 法を応用して新規 HEase 遺伝子をコードする可動性イントロンの同定を試みた。その結果、新しいイントロン挿入部位を合計5箇所同定し、それぞれの挿入部位から可動性イントロンを獲得することに成功した。この成果は *Thermoproteales* 目古細菌の rRNA 遺伝子座が、HEase 遺伝子をコードする可動性イントロンの未開拓な宝庫であることを示すものである。
2. 獲得した新規 HEase 遺伝子の酵素学的な性状を解析するために、大腸菌の T7 発現系を用いて、複数の HEase を大量発現させることに成功した。大量発現させた HEase を用いて、合計7種類の HEase (I-PogI, I-Tsp061I, I-Tsp061II, I-PspM1TI, I-PspM1TII, I-PspM0HI, I-Vdi065I:I-PogI と I-Tsp061I はイソシゾマーである) について、その性状を詳細に解析した。これらの HEase は、合計6種類の新規 DNA 配列を、14-22塩基対の範囲で認識した。そのため、新しい生物ゲノム領域に遺伝子組換えを導入する際などに、これらの HEase の応用が見込める。
3. 既知の HEase の中でも特に高い熱安定性を示す、I-Tsp061I の構造安定化原理を考察するために、I-Tsp061I の結晶構造を 2.1Å の分解能で決定した。そして、その構造を精査した結果、複数の塩橋ネットワーク、プロリン残基に富むドメイン・リンカー領域、活性中心周辺に形成された大きな水素結合ネットワークが、I-Tsp061I の構造安定化に寄与することを明らかにした。これらの構造要素の幾つかは、他の LAGLIDADG 型 HEase にも共通して当てはまるものであった。
4. 互いにイソシゾマーである I-Tsp061I と I-PogI の比較から、HEase の DNA 認識機構について考察した結果、HEase の DNA 結合面に位置するアミノ酸が、互いに影響を及ぼしつつ、酵素/DNA 相互作用を形成することが示唆された。また HEase の厳密な DNA 認識は、その比活性を低く保つことで維持されていることが明らかになった。

以上のように本論文は、超好熱古細菌より6種の新規 HEase を開発してその応用面を広げ構造安定化や DNA 認識機構について多くの知見を示したものであり、分子生物学、遺伝子工学および構造生物学の分野に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成18年2月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した

結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。