

審査の結果の要旨

氏名 王徳龍

本論文は、制限 DNA グリコシラーゼ R.PabI による標的塩基配列の探索・認識・構造変化・切断の各段階の分子機構の解析について述べたものである。これまでに、多数の制限酵素および DNA グリコシラーゼの立体構造が解明され、これらの酵素の標的配列の探索・認識機構が明らかにされている。しかし、R.PabI は制限酵素と同様に特定の DNA 配列を認識する一方で、エンドヌクレアーゼ活性ではなくグリコシラーゼ活性により DNA の切断を引き起こす特徴的な酵素であり、どのようなしくみで標的配列を探索、認識するか不明であった。この問題の解明が本研究の目的である。

本論文は、序章、本論二章、総合考察からなる四章構成である。序章では、制限 DNA グリコシラーゼ R.PabI について従来知見と本研究の目的とが述べられている。第一章では塩基配列認識特異性を欠失した R.PabI 変異体が塩基配列非特異的に二本鎖 DNA に結合した状態の結晶構造が決定され、R.PabI が効率よく標的配列を探索するしくみについて解析が行われた。第二章では塩基配列認識特異性の低下した R.PabI 変異体が特異的配列を含む二本鎖 DNA に結合した状態の結晶構造が決定され、R.PabI が二本鎖 DNA の標的塩基配列の立体構造を変化させるしくみについて解析が行われた。得られた二種類の複合体構造から、標的塩基配列の効率的な探索に関与する残基、二本鎖 DNA の構造変化に関与する残基および標的配列の認識に関与する残基を同定した。総合考察では、本研究成果の意義について述べられている。

本論の第一章では、R.PabI が二本鎖 DNA に結合して、標的塩基配列を探索する状態の立体構造を明らかにするために、R.PabI-配列非特異的二本鎖 DNA 複合体の結晶構造解析が行われた。塩基配列認識特異性を欠失した R.PabI 二重変異体 (R32A/E63A) と、R.PabI 標的塩基配列を含まない二本鎖 DNA の複合体が調製、結晶化され、分解能 1.9 Å の結晶構造が解かれた。この結晶構造において、二つの R.PabI 二量体の一つの二本鎖 DNA を挟み込む、二本鎖 DNA 依存的 R.PabI 四量体構造が形成されていた。二本鎖 DNA に結合した二つの R.PabI 二量体は、二か所で接触しており、一か所の接触面あたり二つの対称的な塩橋を形成し、

合計四つの塩橋形成により四量体構造が安定化されていた。また、R.PabI による配列特異的な DNA 結合に重要な $\beta 8$ - $\beta 9$ ループは、二本鎖 DNA の主溝および副溝上に位置しており、各溝から標的配列の塩基を探索しやすい配向をとっていた。R.PabI 二量体間の塩橋形成に関与する二つの残基の変異体が作製され、その DNA 結合力が測定された結果、電荷的および空間的な反発がある変異体の四量体形成能が低下し、電荷が反転した二重変異体では四量体形成能が回復することが示された。長い二本鎖 DNA を基質として用いた場合、四量体形成能が低下した変異体の酵素活性が大きく低下することが示され、上記二重変異により回復することが示された。この結果から、複合体構造中で見られた R.PabI の四量体構造は、非特異的な二本鎖 DNA の中から、標的配列を効率よく探索するのに寄与する可能性が示唆された。

本論の第二章では R.PabI が標的塩基配列を認識してから二本鎖 DNA を切断するまでの構造変化を解明するために、R.PabI-配列特異的な二本鎖 DNA 複合体の結晶構造解析が行われた。塩基配列特異的な二本鎖 DNA 切断活性が野生型に比べて一千倍低下した R.PabI 二重変異体(Y68F/K154A)と認識配列(5'-GTAC-3')を二か所含む二本鎖 DNA の複合体が調製、結晶化され、2.4 Å 分解能の結晶構造が解かれた。一つの二本鎖 DNA に対し、二つの R.PabI 二量体が三塩基離れた二か所の認識配列に独立に結合していた。R.PabI 二量体と結合した部位において、二か所の二本鎖 DNA の副溝が広がった結果、二本鎖 DNA の形は大きく変化していた。R.PabI と二本鎖 DNA の分子間相互作用は従来知見とは異なっており、R.PabI の $\beta 2$ - $\beta 3$ ループが二本鎖 DNA の副溝内に位置し、副溝の拡張を引き起こしていた。このループ内の残基が DNA の塩基と相互作用することで、標的配列の認識に関わると考えられた。実際にこのループ内のアミノ酸残基の点変異により酵素活性が低下し、その重要性が確認された。複合体中の DNA の各塩基対のジオメトリ計算より、認識配列(5'-GTAC-3')中の T-A 間の塩基対並行面からのずれが一番大きいことが観察された。T-A 間のスタッキング相互作用はすべてのジヌクレオチド中で最も弱いことが示唆されており、今回の二本鎖 DNA 構造の特徴より、R.PabI は認識配列中に存在する T-A 間のスタッキングの柔軟性を利用して標的配列を認識していると推測された。

本論文では、X 線結晶構造解析手法によって、制限 DNA グリコシラーゼ R.PabI が標的配列を効率よく探索する機構、および標的配列を認識してその構造変化を引き起こす機構が明らかになった。本研究の成果は学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。