

## 審査の結果の要旨

氏名 宮元俊輔

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の VMA1 蛋白質からプロテインスプライシングで生ずる遺伝子ホーミングエンドヌクレアーゼ VDE (VMA1-derived endonuclease) は、酵母のゲノム中のただ 1 個所に存在する DNA 領域を塩基配列特異的に認識し、切断する。この酵素活性によって、自己をコードする遺伝子を酵母のゲノムへ挿入する遺伝子ホーミングが惹起される。本論文の研究では、VDE による二本鎖 DNA の認識と切断の機構を三次元構造に基づいて解明することを目的とし、認識する塩基配列の大部分を成す二本鎖 DNA と VDE との複合体の三次元構造を X 線結晶構造解析の手法により明らかにしている。

VDE を過剰に産生する大腸菌から、VDE を大量に調製して結晶化用の試料としている。認識配列の一部を含み、鎖長が異なる二本鎖 DNA として、48 種類を調製し、各々について VDE との複合体の形成能を調べている。結晶化条件の探索を行った結果、19 塩基長のコード鎖と 31 塩基長の相補鎖が形成する二本鎖 DNA を用いることにより VDE との複合体の良質な結晶が得られた。この結晶からの X 線回折強度データをシンクロトロン放射光を用いて収集し、VDE 単体の構造を探索モデルとする分子置換法により初期構造を求めて分解能 2.5 Å で結晶学的に構造を精密化している。

得られた結晶構造では、1 分子の二本鎖 DNA と 1 分子の VDE が複合体を形成している。VDE の 2 つのドメインはともに DNA との相互作用に関わっており、電子密度が鮮明な 19 塩基対の領域は、図に示すように、そのほぼ全長が水素結合と van der Waals 相互作用で VDE と接触し、直線状の B 型 DNA 構造を保持している。図では、19 塩基対の領域を濃い線で示し、基質として認識される残りの 12 塩基対の領域を蛋白質モデリングにより構築し、薄い線で示してある。

複合体の VDE の構造を VDE 単体のものと比較したところ、プロテインスプライシング活性を有するドメインには、二本鎖 DNA との相互作用に伴って構造が顕著に変化する部位が認められた。変化がとくに大きい部位は、アミノ酸残基の番号が 52 - 72 の部位であり、ループ状の主鎖コンフォメーションをとっている。複合体の構造では、このループのアミノ酸残基は DNA の minor groove 側のリン酸基と水素結合を形成している。このループ部位は、おもに水分子を介して DNA 塩基と接触していることから、塩基配列の認識には直接関与することなく複合体形成を安定化すると考察している。

二本鎖 DNA の原子と VDE の原子が水分子を介さずに直接的に水素結合している領域も存在し、塩基部分が水素結合している領域は 19 塩基対の両末端に局在している。コード鎖の 3' 末端側に位置する 7 つの塩基対は、プロテインスプライシング活性を有するドメインのうち、アミノ酸残基 90-103, 126-130 および 168-170 の部位と相互作用している。とりわけ、Arg 94 との間で 2 本の水素結合を形成している隣接する 2 塩基対は近接する Glu 103 との間にも水分子を介して水素結合している。Arg 94 と Glu 103 の間

の水素結合は VDE 単独の構造においては見られず、二本鎖 DNA との結合に伴って生じたもので、これらの空間的な配置が塩基配列の特異的な認識に寄与している。

複合体構造でのコード鎖の 5'末端のリン原子は、コード鎖の切断が生じる

際に求核攻撃を受けると考えられる。この 5'末端および隣接するグアノシンの O6 原子はともに Lys 340 の N $\epsilon$ 原子と水素結合している。19 塩基対長の二本鎖 DNA は、このように塩基が直接的に認識される部分と、水分子を介して間接的に認識される部分から成ることが明らかになった。

34 塩基対から成る二本鎖 DNA の基質を用いると、DNA は 4 塩基離れた位置の 2 箇所で切断される。これは VDE が活性部位を 2 個有することを強く示唆する。研究では、切断部位の一方のみがあらかじめ切断された中間体様の DNA を調製し、VDE による切断を調べている。その結果、コード鎖を切断した中間体様基質はその相補鎖の切断を阻害することが明らかになった。複合体構造中のコード鎖の 5'末端側に 12 塩基対の二本鎖 DNA を継ぎ足したモデルを構築したところ、継ぎ足した二本鎖 DNA の部分が VDE のエンドヌクレアーゼドメインに沿っておよそ 50°湾曲すると考えられ、コード鎖の切断はこの湾曲に影響を与えて他方の切断を阻害していると考えられている。活性に関与するアミノ酸残基としては Asp 218 と Lys 301 などから成る組と、Asp 326 と Lys 403 などから成る組を指摘している。エンドヌクレアーゼドメインは三次元構造からは 2 つのサブドメインに分割でき、これらの活性残基の組は、2 つのサブドメインにそれぞれ分かれて偽 2 回対称の配置にあること、二本鎖 DNA の切断部位がこの組にほぼ合致する位置に来ることを見出ししている。

以上のように、本論文では、遺伝子ホーミングエンドヌクレアーゼ VDE とその認識配列の大部分を成す長鎖の二本鎖 DNA との複合体の三次元構造を解明し、基質 DNA の塩基配列に対する特異的および非特異的な認識の機構の存在を明らかにしている。複合体構造に基づいて、VDE は結合した二本鎖 DNA に構造の変化を引き起こし、非対称的な切断を行う機構も提示している。これらは、遺伝子ホーミングにおけるエンドヌクレアーゼの役割と、蛋白質による遺伝子の制御について重要な知見をもたらす。よって、本論文は、構造生物学および分子生物学の面から薬学の進歩に貢献するところが大きく、博士（薬学）の学位の授与に価すると判定した。

