

Genetic and biochemical characterizations and structural prediction of aLhr1 helicase in the thermophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*

鈴木, 匠爾

<https://hdl.handle.net/2324/4784702>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (農学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	鈴木 匠爾			
論文名	Genetic and biochemical characterizations and structural prediction of aLhr1 helicase in the thermophilic crenarchaeon <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> (好熱性クレンアーキア <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> の aLhr1 ヘリカーゼの遺伝学的・生化学的解析および構造予測)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	氏名 石野 良純
	副査	九州大学	教授	氏名 松岡 健
	副査	九州大学	教授	氏名 中村 崇裕
	副査	九州大学	准教授	氏名 石野 園子
	副査	九州大学	准教授	氏名 沼田 倫征

論文審査の結果の要旨

本論文は、好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* のゲノムにコードされる機能未知のスーパーファミリー2 (SF2) ヘリカーゼが、相同組換え過程で機能することを、遺伝学的手法と生化学的手法を用いて示し、さらに、3次元構造予測によりこの新規ヘリカーゼの構造的な特徴およびヘリカーゼ機能の作用機序を考察したものである。

著者はまず、好熱性アーキア *Saccharolobus solfataricus* において一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) と相互作用する可能性があるとして報告されているタンパク質候補の中に、機能未知の SF2 ヘリカーゼ様タンパク質が含まれていることに注目した。著者は *S. acidocaldarius* で遺伝子破壊実験系を構築していたので、このヘリカーゼ様タンパク質のホモログをコードする遺伝子を *S. acidocaldarius* ゲノムの中から探索し、Saci_0814 を見出した。この遺伝子産物のアミノ酸配列を詳細に観察すると、SF2 ヘリカーゼファミリーの中の archaeal long helicase related (aLhr) と名付けられた系統群に属し、さらに4つのグループのうち、aLhr1 に特徴的なシステイン残基に富む配列を C 末端に有していたので、このタンパク質を SacaLhr1 (遺伝子名を *alhr1*) と名付けた。aLhr1 グループのタンパク質に関してはこれまで解析された報告はない。

著者は、自らが開発した遺伝子組換え系を用いて、*S. acidocaldarius* の *alhr1* 遺伝子破壊株を単離し、細胞外から遺伝子を導入して相同組換え頻度を測定した。その結果、野生株に比べ約 5 倍低下することを発見し、SacaLhr1 が *S. acidocaldarius* 細胞内において相同組換え過程で機能し得ることを示した。

次に著者は、SacaLhr1 の生化学的性質を解析するために、*alhr1* 遺伝子が大腸菌細胞中で過剰発現させて SacaLhr1 を産生させた後、各種クロマトグラフィーを用いて高純度に精製することに成功した。この精製評品を用いて生化学的性質解析を行なった結果、SacaLhr1 は溶液中では単量体として存在し、ヘリカーゼにしばしば見られる環状 6 量体で機能する酵素とは異なること、DNA に依存的な ATP 加水分解活性を有すること、3' → 5' への方向性を持ったヘリカーゼ活性を示すことを示した。さらに、SacaLhr1 は人工オリゴヌクレオチドをアニールして作製した相同組換え中間体である Holliday junction (HJ) を half junction を経由して一本鎖にまで解く活性を示すことを発見し、SacaLhr1 が HJ をプロセスするための分岐点移動に関わる可能性を提示した。

さらに著者は、SacaLhr1 が DNA 上でどのように機能を発揮するのかを解明するために、タンパク質立体構造予測プログラムである AlphaFold2 を用いて 3次元構造予測を行った。得られた予想

構造を、報告されているバクテリア Lhr-ssDNA-AMPPNP-Mg²⁺複合体の結晶構造と比較した結果、バクテリア Lhr で構造を取らない領域に対応する位置に Oligonucleotide Binding (OB) fold をとりうる領域を見出した。また、C 末端領域には aLhr1 群に特有の Zn フィンガーモチーフ (Zn finger) とヘリクスターンヘリクスモチーフ (HTH) 構造が形成されていた。*S. acidocaldarius* において、CTD を持たない *aLhr2* の遺伝子欠失株では相同組換え効率は低下しないという報告があることをもとに、著者は aLhr1 の CTD が相同組換え機能に特異性を示す可能性を示唆した。また、予想構造で観察された OB ドメインの類似構造が、バクテリアの MrfA ヘリカーゼ中に見つかり、これが一本鎖 DNA を捕捉するための構造変化に関与しているという報告を基にして、SacaLhr1 中の OB ドメインの機能予測を行った。以上により、SacaLhr1 は CTD で Holliday junction の二本鎖 DNA 領域に結合し、DNA 上でより安定なコンフォメーションをとるための構造変化に OB ドメインが寄与していること、その後の ATP 加水分解活性に依存したトランスロケーションを介して分岐点移動活性が表れるという反応機構モデルを提唱した。

以上要するに、本論文は超好熱アーキアの機能未知のヘリカーゼを同定し、相同組換え過程で機能することを初めて示したものであり、分子生物学および極限環境生物学の進歩に寄与する価値ある業績と認める。

よって本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有すると認める。