

A-06

超好熱古細菌イントロンの水平伝播を司る鋸酵素 I-ApeII の機能と構造

さこ よしひこ もりなが やよい のむら のりみち

○左子 芳彦, 森永 弥生, 野村 紀通

(京大院・農学研究科・応用生物学専攻)

【目的】

ある種のイントロンは「可動性遺伝因子」の性質を有しており、出芽酵母、単細胞緑藻、バクテリア、オファージ等のいくつかの微生物ゲノム上には可動性イントロンの存在が確認されている。我々はこれまでに古細菌 rRNA 遺伝子構造の包括的な比較解析から以下のことを解明した^{1)~6)}。

(a) Crenarchaeota 門に属する種の rDNA には可動性イントロンが散在する。

(b) イントロンの挿入が頻発するホットスポットは rDNA 領域の 19 箇所に限定される。

(c) 可動性イントロンの内部にはホーミングエンドヌクレアーゼ遺伝子がある。

以上の知見は、天然の古細菌群集においてホーミング機構により可動性イントロンの水平伝播現象が起こっていることを強く示唆するものである。可動性イントロンがいかんにして転移標的を選択するのかという問題を検討するために、我々は現在、ホーミングエンドヌクレアーゼ (HEase) の DNA 塩基配列認識機構と立体構造に焦点を絞って研究を進めている。本研究では、超好熱古細菌から新規に見い出された LAGLIDADG ファミリー HEase, I-ApeII の機能と構造について報告する。

【方法】

超好熱古細菌 *Aeropyrum pernix* K1 の 23S rRNA 遺伝子に存在する可動性イントロン ApeK1. L1927 の内部 ORF を大腸菌 T7 系を用いて高発現させ、その ORF 産物を精製して生化学的解析に用いた。エンドヌクレアーゼ活性の測定温度は 90°C (I-ApeII) および 25°C (I-PpoI) とした。

【結果・考察】

イントロン ApeK1. L1927 の内部 ORF の産物が 90°C で部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を有することを確認し、I-ApeII と名づけた。I-ApeII のアミノ酸配列 (167 残基) は LAGLIDADG モチーフを 1 つのみ含んでいた。I-ApeII は分子量 38 kDa のホモダイマー酵素であり、古細菌細胞内でも発現していることが示された。I-ApeII は 22 bp の偽回文 DNA 配列 (5' -CTGACTCTC⁺TTAA*GGTAGCCAA; *および ^ はそれぞれ top strand, bottom strand の切断部位を示す) を認識・切断した。切断部位は、イントロン ApeK1. L1927 付近であった。

I-ApeII の認識配列同定の結果、この酵素が粘菌 *Physarum polycephalum* 由来の His-Cys box 型 HEase, I-PpoI のイソゾマーである事が判明した (I-PpoI は group I セルフスプライシングイントロンにコードされ、至適活性温度 25~30°C である)。両者のアミノ酸配列の一致度は 11.6% であり、立体構造がフォールドレベルで異なると予測された。それぞれの塩基配列認識機構を明らかにするため、認識配列の全ての座位に一塩基置換や多重塩基置換を導入した約 120 種類の変異基質群に対する切断効率を体系的に測定した。その結果、いずれの HEase とも多くの塩基置換パターンに寛容であったことから、HEase は長い塩基配列を低い厳密性で認識することにより、高い基質特異性と基質多選択性を両立させていると考えられた。しかしながら、基質認識において特に重要な塩基の配置が両者の間で部分的に異なったことから、それぞれ独自の様式で同一の塩基配列を認識すると考えられた。この二つの酵素遺伝子間に進化的類縁性は認められないため、同一の DNA 配列に対する相互作用 (適応) を独立に進化させた結果、機能的収斂が生じたものと考えられる。本報告は、同一の DNA 配列に対する異なる複数の分子認識様式の見出した最初の例であり、今後構造生物学的な側面から HEase /DNA 相互作用を探究する上で重要なモデルとなり得る。

【引用文献】

- 1) Nomura, N., Sako, Y., Uchida, A. (1998) J. Bacteriol. 180, 3635-3643.
- 2) Nomura, N., Morinaga, Y., Kogishi, T., Kim, E., Sako, Y., Uchida, A. (2002) Gene 295, 43-50.
- 3) Morinaga, Y., Nomura, N., Sako, Y. (2002) Microbes Environ. 17, 153-163.
- 4) Itoh, T., Nomura, N., Sako, Y. (2003) Extremophiles 7, 229-233.
- 5) Nakayama, H., Morinaga, Y., Nomura, N., Nunoura, T., Sako, Y., Uchida, A. (2003) FEBS Lett. 544, 165-170.

左子芳彦, sako@kais.kyoto-u.ac.jp