

論文審査の結果の要旨

氏名 栗本 一基

AUH (AU-binding homologue of enoyl-CoA hydratase)は、既知の RNA 結合タンパク質とアミノ酸配列上の相同性を有さない新規 RNA 結合タンパク質である。一方で、AUH は脂肪酸の β 酸化を触媒する酵素 enoyl-CoA hydratase と相同性を有しており、enoyl-CoA hydratase/isomerase superfamily に属している。AUH は enoyl-CoA hydratase と同様の反応を触媒する弱い活性を保持している。本論文では、AUH の X 線結晶構造解析を行い、AUH の RNA 結合能と酵素活性に関する研究を行っている。

第 2 章では AUH の X 線結晶構造解析について述べている。AUH を GST との融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、あとから GST を切り離している。NMR 法を用いて、6 ヌクレオチドの RNA 配列 AUUUAG が AUH と相互作用することを見だし、AUH と AUUUAG、interleukin-3 由来の ARE (33 ヌクレオチド)との共結晶化をこころみている。AUH と AUUUAG を混合した条件で良質な結晶が現れ、構造解析に至っている。初期位相の決定は、既に報告されている enoyl-CoA hydratase の結晶構造をサーチモデルとした分子置換法をもちいておこなっている。Non-crystallographic symmetry (NCS) averaging をもちいた density modification によって電子密度が著しく改善され、2.2 Å までの分解能で構造を精密化している。しかしながら、結晶化の際に加えた RNA の電子密度を結晶構造中に見出すことはできなかった。

第 3 章では、AUH の立体構造を詳細に述べている。論文提出者は、Enoyl-CoA hydratase/isomerase superfamily に属する他のタンパク質の構造と比較して共通点と相違点を見いだしている。AUH の構造は、全体としては enoyl-CoA hydratase

や dienoyl-CoA isomerase と類似していたが、2つの3量体の間には、これらのタンパク質には見られない幅の広い溝が形成されていた。また、enoyl-CoA hydratase/isomerase superfamily に属する他のすべてタンパク質で、タンパク質表面に負の電荷が分布していたのとは対照的に、AUH では6量体表面に正の電荷が分布していた。これらの知見から、論文提出者は、AUH は3量体間の溝に RNA を挟みこみ、正の電荷によって RNA のリン酸基と静電的な相互作用をするのではないかと考察している。さらに結合に重要であると考えられるリジン残基を他のアミノ酸に置換した変異体を作成し、これらのリジン残基が RNA との結合に必要なことを示している。

また、論文提出者は、活性ポケットの構造を enoyl-CoA hydratase と比較している。AUH の活性ポケットは、全体的には enoyl-CoA hydratase と類似していたが、enoyl-CoA の脂肪酸鎖と直接相互作用しうるポケットの底部の構造が大きく異なっていた。Enoyl-CoA hydratase ではポケットの底部は柔軟なループで形成されていたのに対し、AUH では α -ヘリックスで形成されていた。これらの知見を元に、論文提出者はポケットの構造の共通点と相違点が、AUH の酵素活性にどのように反映されているかを調べている。その結果、AUH の crotonoyl-CoA (C_4) に対する K_M 値は enoyl-CoA hydratase とほぼ同じ値であったが、 k_{cat} 値は enoyl-CoA hydratase よりもはるかに小さい値であった。また、enoyl-CoA hydratase は C_4 から C_{16} までの長さの脂肪酸鎖をもつ enoyl-CoA を基質とすることが知られているが、AUH は C_{16} の enoyl-CoA に対する活性を持っていなかった。論文提出者は、AUH が C_{16} の enoyl-CoA に対する活性を持っていないのは、ポケットの底部が堅い構造をしているために、長い脂肪酸鎖をもつ enoyl-CoA を受け入れることができないからであると考察している。

なお、本論文は、東京大学の横山茂之教授、武藤裕講師、濡木理助手、深井周也君との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。