

審査結果の要旨

論文提出者氏名 齊藤 博英

本論文は試験管内人工進化法 (SELEX と呼ぶ) により、tRNA にアミノ酸を結合させる能力のある RNA 分子 (リボザイム) を創成取得し、その構造解析を行ない、さらにその反応機構について考察したものであり、全 8 章からなる。

第 1 章では本研究の目的を述べている。これまでの研究成果から、生命の起源は蛋白質合成系の起源と深い関りがあり、そこには RNA 酵素 (リボザイム) が本質的な役割を担っていた可能性が指摘されてきた。本論文で扱う tRNA のアミノアシル化は、この蛋白質合成の入り口に位置する重要な反応であるが、現在の生物ではこの反応はアミノアシル tRNA シンテターゼ (ARS) という蛋白性酵素で触媒されている。この反応がリボザイムで触媒できるか否かを実験的に検証することが本研究の目的である。

第 2 章は本研究の背景の概観である。蛋白質合成系の起源の関するこれまでの仮説やそれを検証する有力な手段である試験管内人工進化法について詳しく解説している。

第 3 章では反応に必要な基質の調製法について述べている。活性化アミノ酸供与体としての N-ビオチニル-L-フェニルアラニル-シアノメチルエステル (ビオチン-L-Phe-CME)、フェニルアラニルアデニレート (Phe-AMP)、フェニルアラニルチオエステル (Phe-TE)、および 70 残基をランダム化したリボザイム領域にモデル tRNA の結合した全長 150 残基からなる DNA プール、などの合成法である。

第 4 章では RNA 試験管内進化法を用いて、上記のフェニルアラニンの活性体を基質として自己アミノアシル化反応を行う tRNA 前駆体 (pre-tRNA: リボザイム活性のある 5'リーダ部位と tRNA から構成される) を創成した経過を述べている。上記 DNA プールを鋳型分子として、T7 RNA ポリメラーゼにより RNA に転写、ついで DNA に逆転写するという分子進化実験を 17 世代にわたりくり返した結果、非酵素反応と比較して 1.6×10^5 倍自己アミノアシル化を促進する pre-tRNA が得られた。さらに興味深いことに、この pre-tRNA は、自然界に存在するリボザイムである RNaseP RNA によって切断され、切断された 5'リーダ部位は、tRNA を *in trans* でアミノアシル化できることがわかった。それゆえに、この 5'リーダ-RNA は、tRNA のアミノアシル化を触媒する ARS-リボザイムとして機能する

と結論された。

第5章ではこのARS-リボザイムの速度論及び生化学的解析から、このリボザイムはフェニルアラニンの活性体（特に生体内アミノアシル化反応に必須であるアミノアシルアデニレート）を基質として認識できること、tRNAの3'末端配列CCAとそれに隣接するディスクリミネーター塩基が反応に必須であること、tRNAのCCA末端A残基の3'-水酸基を優先的にアミノアシル化すること、tRNAの祖先と考えられているミニヘリックス（tRNAのアクセプターステムとT ψ Cループから構成される）をアミノアシル化できること、などを見出し、天然のARSと同一の反応特異性をもつことを明らかにした。

第6章では生化学的手法を用いたこのARS様リボザイムの構造解析から、ARS-リボザイムのtRNA認識機構を検討した。部位特異的塩基置換法の結果、ARS-リボザイムに存在するGG配列が、tRNA3'末端のCCと塩基対を形成し反応を促進していること、この塩基対はアミノアシル化反応に必須であることを見出した。このようなtRNA3'末端のCC配列とリボザイムの塩基対を介した相互作用は、RNaseP RNA やリボソーム大サブユニットに存在する23S tRNAなどのリボザイムでも見られることから、tRNAとリボザイムの本質的相互認識部位として共進化した可能性が示唆された。

第7章ではこのリボザイムの金属要求性を調べている。

第8章は、本研究の総括である。本研究によってtRNAをアミノアシル化する能力をもつARS-リボザイムが創成できたことから、蛋白質合成系の起源においてリボザイムがアミノ酸のtRNAへの結合を触媒し、初期遺伝暗号の形成に本質的役割を果たしたことが強く示唆された。

以上、本論文は、RNA分子進化工学を用いて、世界で初めてtRNAのアミノアシル化を触媒するリボザイムを創成し、その機能構造解析を行ったものである。この成果は、蛋白質合成酵素の起源がRNAであることの重要な根拠となり、生命の起源においてリボザイムが重要な役割を果たしたことを強く示唆するものであり、生命科学の基礎および応用面におけるその意義は大きい。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。