

審査の結果の要旨

氏名 泊 幸秀

現在までに一次構造が決定された tRNA の 3'末端は、例外なく CCA という配列で保存されており、この配列は tRNA の機能発現において重要な役割を担っている。CCA 配列は tRNA のプロセッシングやアミノ酸受容能に必須であるとされ、また、翻訳の過程においても、CCA 配列が大サブユニットリボソーム RNA のドメイン V とされる領域と相互作用する事によって、tRNA の 3'末端に結合したアミノ酸をペプチド転移反応の活性中心に配置することが可能になると考えられている。

CCA 末端修復酵素[ATP (CTP): tRNA nucleotidyltransferase]は、この tRNA 3'末端 CCA 配列の合成または修復反応を触媒する酵素である。本酵素は nucleotidyltransferase superfamily の中でも、tRNA 様の構造を認識し、核酸などの鋳型なしに正確に CCA 配列を付加するという特徴的な性質を持っている。CCA 配列が tRNA 遺伝子にコードされていない生物(真核生物、多くの原核生物、一部の古細菌、およびオルガネラ)では、この酵素による CCA 付加が tRNA の成熟過程において必須のプロセスであり、また、CCA 配列が tRNA にコードされている生物(少数の原核生物、一部の古細菌)においては、エキソヌクレアーゼなどにより tRNA の 3'末端が損傷を受けた場合に、CCA 末端修復酵素がそれを修復する役割を果たしていると考えられている。

本論文では、この酵素に着目し、1. CCA 配列付加のメカニズム、2. ミトコンドリア CCA 末端修復酵素による tRNA 様構造認識の進化的変化、3. 哺乳動物における細胞内での CCA 末端修復酵素の局在と特異性 4. ミトコンドリア病の病因性変異を持つミトコンドリア tRNA における CCA 末端付加効率の低下の 4 点について、解析と考察を行っている。

第 1 章は CCA 末端修復酵素のこれまでの知見に関する導入部である。

第 2 章では、大腸菌の CCA 末端修復酵素が、酵素単体で CCA という特徴的な配列を合成するメカニズムについて解析を行っている。基質であるヌクレオチドと酵素との関係に着目し詳細な実験を行った結果、a.酵素単体に対して ATP が非常に強く結合できる、b.酵素の内在的活性である poly(C) polymerase 様活性を ATP が制御している、c.poly(C)反応においては 3 つ以上の C が付加すると tRNA がトランスロケーションを起こすことで反応速度が著しく低下する(すなわち、酵素そのものが poly(C)の長さを CC に規定している)という生化学的事実を見出し、それらの知見に基づき”Dead-end ATP incorporation model”という新たな反応モデルを提案している。

第 3 章では、後生動物ミトコンドリアにおいて、塩基数が縮小し異常構造を取り、CCA 末端修復酵素の認識部位であるとされてきた T ループ近傍の保存配列や構造を欠いているミトコンドリア tRNA を、ミトコンドリア CCA 末端修復酵素がどのように認識しているのか、という疑問点について解析を行っている。大腸菌、ヒトおよび線虫のミトコンドリアの CCA 末端修復酵素の基質認識を検討し、後生動物ミトコンドリア CCA 末端修復酵素の基質認識機構

と、tRNA の異常構造との間の進化的な相関を明かにしている。また、この酵素の遺伝子のゲノム進化学的考察も行われている。

第4章では、ウシ肝臓の細胞質画分より精製した CCA 末端修復酵素の解析、また HeLa 細胞を用いた EGFP レポーターアッセイ等の実験から、哺乳動物において、ミトコンドリアと細胞質の CCA 末端修復酵素が同一の遺伝子由来であるという事実を初めて示し、その細胞内での局在のメカニズムを明らかにしている。また、ミトコンドリアと細胞質の酵素の質的な違いと基質認識との関係についても考察を加えている。

第5章では、致死性心筋症、幼児突然致死症候群を引き起こす2種類のミトコンドリア病原変異をもつヒトミトコンドリア tRNA に対する CCA 付加効率が顕著に低下しているという事実を初めて示し、また、それが変異 tRNA の構造変化によるものであることを明らかにしている。これらの事実は、ミトコンドリア病原変異がミトコンドリアの機能異常を引き起こす分子メカニズムに関して新たな知見を与え、発病の解明ひいては遺伝子治療につながる重要な解析であると考えられる。

第6章は、総合討論であり、ごく最近になって明らかにされた *Bacillus stearothermophilus* の CCA 末端修復酵素の ATP および CTP との複合体の結晶構造と、執筆者らが得た生化学的事実との相関、および今後の展望に関して考察を行っている。

以上本論文は、CCA 末端修復酵素という一つの酵素に着目し、その反応機構、基質認識、細胞内局在、という基礎的解析から、ヒトの疾患との関連という応用的事象まで、一貫した解析と考察がなされており、化学生命工学、特に生化学・分子生物学分野での発展に寄与するものである。

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。