

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小川 哲 弘

トキシンは、変異と並んで生命の巧妙な仕組みを切り取る強力な研究手段を提供する。コリシン E5 と D はそれぞれ大腸菌のプラスミドが生産するバクテリオシンであり、いずれも感受性大腸菌のアミノ酸取り込みを消失させるためリボソームを失活させると信じられてきたが、具体的な作用機構は不明であった。申請者は、コリシン E5 と D がいずれもリボソームに働くのではなく、細胞内のそれぞれ特定の tRNA を特異的に切断する初めてのトキシンであることを明らかにした。即ちコリシン E5 の C 末端活性ドメイン(E5-CRD)は、チロシン、ヒスチジン、アスパラギン、アスパラギン酸の tRNA のアンチコドン 1 文字目と 2 文字目の間のホスホジエステル結合を切断し、コリシン D はアルギニンの 4 種のアイソアクセプター-tRNA のアンチコドンループの 3'末端を同様に切断することを示した。本論文では、以上の作用機構のほか、コリシン E5 が基質 tRNA の標的部位を特異的に識別する分子機構を解明し、さらにコリシン E5 の tRNA 切断機能を真核生物へ拡大してその利用について検討を加えた。本論文は序章および七章よりなる。

本研究の背景と位置づけを述べた序章に続き、第一章では、コリシン E5 の活性ドメイン E5-CRD およびその特異的インヒビタータンパク質である ImmE5 を単離・精製し、それらの性質と、特に大腸菌 *in vitro* タンパク質合成系に及ぼす作用を調べている。E5-CRD は、実際にタンパク質合成系を阻害するリボヌクレアーゼであったが、rRNA を切断してタンパク質合成能全般を低下させるコリシン E3 とは対照的に、アミノ酸特異的な阻害効果を持つことを示した。

第二章では、コリシン E5 の示す殺菌作用と、E5-CRD の示す特異的 tRNA の切断活性との関係を検討している。生育中の大腸菌に各種濃度のコリシン E5 を加えた時の、細胞の生存率と細胞内 tRNA の切断の程度を詳細に比較し、細胞内 tRNA の切断が殺菌量以下のコリシンでも起こる高感度な変化であることを示して、E5 感受性 tRNA の切断がコリシン E5 の殺菌作用の原因であると結論した。

第三章では、E5-CRD の酵素学的性質を検討している。E5-CRD は 2', 3'-環状リン酸と 5'-OH を生じるリボヌクレアーゼであるが、既知のヌクレアーゼと配列相同性がないばかりか、既知のヌクレアーゼで広く触媒基として働くヒスチジン残基を分子内に含まず、反応に金属イオンも要求しない新規性を持つことを示した。また活性は高 pH で高く、アルギニン残基と二つのリジン残基の関与する全く新しい反応機構を持つことを示した。

第四章では、tRNA のアンチコドンステム/ループを擬した各種の RNA ミニヘリックスを基質に用い、E5-CRD が認識する tRNA 上の構造を解析している。E5-CRD の基質として必要なのは、アンチコドンの-1~3 文字目が (C/U)GUN であることであり、3 文字目の

NにもAを最適とする好みの序列があることを示し、これらの性質で4種の基質 tRNA に対する E5-CRD の好みの説明された。また切断されるGU配列の両側にサブサイトの存在を仮定する一方、アンチコドンループの立体構造に反応が依存する可能性を示した。

第五章では、各種合成ヌクレオチドを基質に用いた E5-CRD の酵素反応速度論的解析を行っている。配列特異性を備えた E5-CRD の最小基質はGpUpであり、塩基配列特異的切断を示すという意味で E5-CRD が「RNA制限酵素」であることを示した。またGpUpとその3'側、5'側に塩基を延長したオリゴヌクレオチドに対する反応を比較し、オリゴヌクレオチドに対する明確なサブサイトは存在しないと結論した。一方、E5-CRD と基質アナログとの共結晶のX線構造解析により、E5-CRD は基質のGとUの両塩基をスタッキングと水素結合で固定しており、タンパク質である E5-CRD は、tRNA アンチコドンに対して mRNA 上のコドンに「分子擬態」していることを明らかにした。

第六章では、E5-CRD の標的が生物に普遍的な tRNA アンチコドンであるため、大腸菌以外にも働きうるという考えをもとに、E5-CRD に対する真核細胞の応答を調べている。まず出芽酵母 tRNA のうち、大腸菌で E5 感受性を示すのと同じ種類の tRNA 分子が *in vitro* で切断されることを示した。また酵母細胞内で E5-CRD 遺伝子を誘導発現させると生育が阻害されること、またインヒビターである ImmE5 を E5-CRD と共発現させることによって、E5-CRD 発現に伴う生育阻害が解除されることを示した。即ち E5-CRD は出芽酵母に対しても特定の tRNA を切断する細胞毒性をもつこと、そしてそれが ImmE5 により制御可能であることを示した。さらに E5-CRD が動物培養細胞に対しても細胞毒性のあることを示唆した。

第七章では、総括を行い、今後の研究の発展性について議論した。また、E5-CRD の基質認識を X 線結晶構造解析の情報を元に議論した。さらに、コリシン D に関する研究の現状をまとめた。

以上、本論文は tRNA 特異的なトキシンの存在を示してその作用機構を解明し、特にコリシン E5 の基質認識の機構を明らかにするとともに、この特性を活かした利用法の確立を目指したものであり、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。