

# 論文審査の結果の要旨

氏名 仙石 徹

ヘリケース (helicase) は、核酸の高次構造を変化させる ATP 駆動の分子モーターである。反応サイクルにおいてヘリケースは ATP の結合と加水分解に伴って構造変化を起こし、それにより核酸のトランスロケーションを行い、二本鎖解離などの核酸の様々な構造変化を触媒する。これによってヘリケースは遺伝情報の発現と維持に関わる様々な過程において重要な役割を果たしている。

スーパーファミリー2 (SF2) はヘリケースの最大のスーパーファミリーであり、RNA ヘリケースである DEAD-box ファミリーや他の様々なタンパク質を含む。Vasa はショウジョウバエの DEAD-box RNA ヘリケースであり、特定の mRNA の翻訳開始を促進することにより腹部と生殖細胞の分化に働いている。

これまでに、SF2 に属する C 型肝炎ウイルス由来 NS3 ヘリケース (NS3) と一本鎖 DNA との複合体が構造解析されており、これが SF2 タンパク質のヘリケースドメインが核酸を結合した唯一の構造であった。この構造は ATP やそのアナログを含まない条件で構造決定されており、反応サイクルにおける ATP フリー型構造を表すと考えられる。一方で、SF2 ヘリケースが ATP アナログと核酸を結合した構造はいまだに決定されておらず、ATP の結合と加水分解に伴って起こる構造変化は明らかになっていなかった。

論文提出者は、SF2 ヘリケースの反応メカニズムを解明するために、Vasa•RNA•ATP アナログ (AMPPNP) からなる三重複合体の結晶構造解析を行った。

本論文は 3 章からなる。第 1 章は、研究の背景と目的について述べられている。

る。第2章は、VasaVasa•RNA•AMPPNP 複合体の結晶構造 RNA•AMPPNP 複合体の結晶構造決定までの過程について述べられている。Vasa は全長では結晶化しなかったため、論文提出者はまず結晶化に適した断片の検討を行っている。そして、poly(U) RNA と AMPPNP との複合体の結晶化を行い、セレノメチオニンを用いた多波長異常分散法を用いて 2.2 Å 分解能での構造決定に成功している。

第3章では、まず決定された構造に基づいて、ATP 加水分解メカニズムと RNA 結合メカニズムについて述べられている。その後、NS3 ヘリケース•DNA 複合体との構造比較に基づいて、SF2 ヘリケースの反応メカニズムについての議論が述べられている。Vasa は他の SF2 タンパク質と同様に、2つの RecA-like ドメイン（N 末端側の NTD と C 末端側の CTD）を持っていた。AMPPNP はドメイン間の溝に結合しており、両ドメイン上の保存モチーフ（NTD 上のモチーフ I、II と、CTD 上のモチーフ VI）が共同的に 3 リン酸部分を結合して ATPase 部位を形成していた。さらに、ATP 加水分解時に求核攻撃を行うと考えられる水分子が構造中で観測されている。すなわち、本研究で決定された構造は ATP 加水分解の直前状態をとらえたものであり、反応サイクル中における ATP 結合型構造を表すと考えられる。一方で、RNA はドメイン間の溝と垂直な方向に伸びており、5'側は CTD に、3'側は NTD に結合していた。GG モチーフ、モチーフ Ia、Ib、IV、V 由来の保存された残基が RNA の糖リン酸骨格と密接に相互作用しており、RNA の配列非特異的な結合を実現していた。

NS3•一本鎖 DNA 複合体（ヌクレオチドフリー型）との構造比較から、Vasa の構造において CTD がより NTD に近づいており、ドメイン間の溝が狭くなっていることが示された。論文提出者は、AMPPNP (ATP) の 3 リン酸部分を介したドメイン間相互作用の有無が、全体的なドメイン運動に結びつくことを示唆している。また、ドメイン運動の結果、核酸結合様式も変化しており、ATP 結

合型の Vasa より ATP フリー型の NS3 は 1 ヌクレオチドだけ長い核酸配列を結合していることが示された。これらの観察から申請者は、SF2 ヘリケースがいわゆる「inchworm (尺取虫) メカニズム」によって機能することを主張している。それによると、SF2 ヘリケースは ATP を結合すると収縮型構造 (Vasa 複合体、NTD と CTD が近づいている) を、ATP 加水分解後には伸長型構造 (NS3 複合体、NTD と CTD が離れている) をとり、それに伴って両ドメイン上の核酸結合部位が互いの距離を変化させ、トランスロケーションを行うと考えられる。

なお、本論文は、東京大学の横山茂之教授、濡木理助教授 (現・東京工業大学教授)、理化学研究所の中村輝博士、堂前直博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及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。