

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井上 咲良

近年、生命にとって RNA の分解はその合成に劣らず多彩な重要性を持つことが認識されるようになってきた。コリシン E5 は Tyr, Asp, His, Asn の tRNA を切断して大腸菌を殺すタンパク質性毒素である。これらの tRNA にはアンチコドンに共通の配列 QU (Q は G の修飾ヌクレオチド) が存在する。コリシン E5 の C 末端 RNase ドメイン E5-CRD は、この QU 間、あるいは一般に 1 本鎖 RNA の GU 間を切断し、2', 3' 環状リン酸と 5' 水酸基の末端を生じる環状化リボヌクレアーゼである。E5-CRD は、この配列特異性がユニークなだけでなく、既知のリボヌクレアーゼで触媒残基として必須な His を分子中に持たない点で、反応機構も新規であることが予想されていた RNase である。本論文は、この触媒機構の解明を目指して、E5-CRD の部位特異的変異を多数作製し、それらの酵素学的解析を行って新しい反応機構モデルを提唱したものであり、3 章からなっている。

第 1 章では、まず E5-CRD と基質アナログ dGpU との複合体の X 線結晶構造解析情報に基づいて、基質の切断に関与しうるアミノ酸残基に関する多数の点変異体を作製し、コリシンとしての殺菌活性を評価した。さらに重要と思われる残基に関する変異体 E5-CRD を精製し、tRNA のアンチコドンアームを模した RNA あるいは最少の特異的基質 GpUp に対する反応を定量的に評価して、Lys25, Gln29, Arg33, Lys60, Ile94 が E5-CRD の触媒反応に深く関与することを示した。

一般に酵素の pH 依存性は触媒残基の pKa を反映するので、一般酸塩基触媒となる残基を変異させると pH 依存性が変化する。E5-CRD の RNA 切断活性の pH 依存性は中性から pH9.5 まで増大するパターンを示すが、上記 5 残基に関する変異体の pH 依存性は野生型と変化がなかったため、いずれの残基も一般酸塩基触媒ではなく、水分子由来の OH がグアノシンの 2'-OH から H⁺ を引き抜く塩基触媒として機能する、すなわち E5-CRD は RNA の自発的な切断であるアルカリ開裂反応を促進していると結論づけている。

よい基質 GpUp に比べて GpU に対する E5-CRD の反応速度は 10⁻³ 程度しかなく、U の 3' リン酸が反応に重要であることを見出した。一方、Lys25 の Gln 変異体 K25Q は野生型 E5-CRD に比べて、GpUp と GpU いずれに対しても切断活性が大きく低下するが、Lys60 の変異体 K60Q は GpUp に対する活性は同様に低下するのにならば GpU に対しては変化がない。この結果から Lys60 が GpUp の 3' リン酸と相互作用することにより反応を加速していることを明らかにした。

最終的に、Arg33, Lys25, Lys60 を中心とするそれぞれの残基の役割を推定して、切断されるホスホジエステル結合が 5 配位中間体を経て開裂する in-line 反応機構に到達している。

第 2 章では、遊離型 E5-CRD の立体構造を X 線結晶構造解析により決定している。基質結合型 E5-CRD と多くの部分で立体構造は一致するが、Lys60 を含むループの

flexibility が高く、Lys60 は基質の結合によって induced-fit 的に活性中心に配置されることが示された。

コリシン E5 は ColE5 プラスミドを持った大腸菌が生産するが、本プラスミドは生産菌の自殺を防ぐため、コリシン E5 に対する特異的阻害タンパク質 ImmE5 を合成している。第 3 章では、E5-CRD とこの阻害タンパク質 ImmE5 との結合について論じている。ImmE5 は E5-CRD に対して基質と同じ部位に結合する。E5-CRD と ImmE5 の複合体、E5-CRD と基質アナログとの複合体、および遊離型 E5-CRD の立体構造を比較して、E5-CRD が、基質のみならず ImmE5 に対しても結合時に induced-fit 的に構造を変化させていることを示している。さらに ImmE5 の E5-CRD 結合面は、基質ジヌクレオチドを分子擬態して、RNA との結合に使われるのと共通した結合を利用していることを明らかにしている。

以上、本論文において、E5-CRD の活性残基は酸塩基触媒として作用せず、RNA 鎖の自発的な切断反応を加速するという、環状化リボヌクレアーゼとしては全く新規な反応機構を提案した。E5-CRD の構造と反応機構はリボヌクレアーゼの多様性を示すものであり、学術上、応用上貢献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。