

論文審査の結果の要旨

氏名 サリン チムナロン

アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS) は転移 RNA (tRNA)の 3' 末端に、対応するアミノ酸を結合させる反応の触媒をしている酵素であり、20 アミノ酸それぞれに対応する 20 種類の aaRS が存在し、aaRS は対応するただひとつのアミノ酸と 1 セットの tRNA を厳密に識別する。この認識の厳密さそのものが翻訳の正確さを制御していると考えられている。セリル tRNA 合成酵(SerRS) は tRNA^{Ser} の特徴的な長く伸びたバリアブルアーム(variable arm) を強く認識していることが生化学的解析および共結晶構造解析によって明らかにされている。しかし、動物ミトコンドリアの中に存在する二つの tRNA^{Ser}(mt tRNA^{Ser}) はこの特徴的な長いバリアブルアームを全く持っていない。

本論文では、ミトコンドリア SerRS (mt SerRS) の mt tRNA^{Ser} の認識メカニズムを分子レベルまで解明するために、ウシ mt SerRS の結晶化及び X 線結晶構造解析の研究を行っている。

第一章では、翻訳系における tRNA 及び aaRS のそれぞれの特徴と役割についての概論を述べている。さらに、結晶構造が解かれているバクテリア SerRS の立体構造及び tRNA^{Ser} の認識メカニズムを詳しく解釈し、これに対して、ミトコンドリアの翻訳系の特徴やバクテリアとの違いについて述べている。本研究室では、以前、ウシ肝臓から mt SerRS を単離精製し、配列を決定することに成功している。さらに、tRNA 変異体などを用いて解析した結果、mt SerRS は二つの mt tRNA^{Ser} の T ループを代わりに認識しており、一方、mt tRNA^{Ser}_{UGA} には T ループと D ループの相互作用が必要であることも明らかになっている。この結果から、本論文では、mt SerRS は二つの基質 tRNA を違った認識様式をしていると考え、初めて提唱されたデュアルモード認識様式 (dual mode recognition) の分子機構を解明することを目的としている。

第二章では、結晶構造解析においての長い道のりの詳細を述べている。本論文では、ウシ mt SerRS を発現ベクターにクローニングし、大腸菌内で大量発現させ、三段階のカラムクロマトグラフィーにより精製を行っている。結晶化条件の検討の結果、1.65 Å の高分解能を示す結晶をポリエチレングリコール 8000 と硫酸リチウムの組み合わせの沈殿剤によって得ており、シンクロトロン放射から得られたデータを分子置換法によって構造決定に成功している。

第三章では、決定された mt SerRS の立体構造について述べている。アミノ酸配列の比較から、mt SerRS は tRNA の識別に関わる N 末端の長いヘリックスドメインにはほとんど相同性がないにもかかわらず、mt SerRS も長いヘリックスアームを持っていることを明らかにしている。さらに、mt SerRS にしか見られない特徴が 3 つあることを発見している。一つ目は、長いヘリックスアームの先端に非常に極性に富んだアミノ酸残基(グルタミンとアスパラギン)からなるループが存在していること、二つ目は、N 末端に一本の短い α ヘリックス付加されていること、そして、三つ目は、C 末端に長く伸びた延長ループがあることを示している。これらをそれぞれ、ティップループ(tip loop)、ディスタルヘリックス(distal helix)と C テール(C-tail) と命名している。ディスタルヘリックスは長いループ(~25 Å) を介して N 末端に付加されており、一方、一本の短い β -シートを含む C テールは二量体のインターフェースの一部を形成していることを見出している。また、ディスタルヘリックスと C テールは二量体中では近傍に位置し、水素結合をしていることを示してい

る。これら三つの特徴は哺乳動物ミトコンドリア SerRS の間で高く保存されており、奇妙な mt tRNA^{Ser} の認識になんらか関わっていると考えられている。後半では、mt tRNA^{Ser} の識別のメカニズムを検証するために、mt SerRS の tRNA ドッキングモデル及び変異体解析について述べている。tRNA ドッキングモデルでは、二量体中のディスタルヘリックスと C テールが結合する tRNA と大きくクラッシュしていることを示し、mt SerRS の変異体解析では、ディスタルヘリックスと C テールの欠損タンパクはアミノアシル化活性を失っていることを見出している。これらの結果より、mt SerRS は他の SerRS と違い、特徴的なディスタルヘリックスと C テールを使って、tRNA^{Ser} を認識していることを見出した。これに対し、K93A の変異体は mt tRNA^{Ser}_{UGA} にだけ、活性の低下をもたらしたことから、Lys93 は片方の tRNA^{Ser}_{UGA} の認識にだけ使われていることを明らかにしている。

終章では、結晶構造及び変異体解析の結果より、mt SerRS の tRNA^{Ser} 認識の分子機構、さらに tRNA 認識の進化モデルについての総括を述べている。mt SerRS の Lys93 残基が mt tRNA^{Ser}_{UGA} の T ループと D ループの相互作用をチェックしている可能性があることを示し、mt tRNA^{Ser} のデュアルモード認識様式の正体であることを提唱している。進化の過程で、失われた tRNA^{Ser} のバリエーションを補うように mt SerRS は N 末端のディスタルヘリックス及び C テールを獲得して mt tRNA^{Ser} 上の新たなアイデンティティを見つけ出し、さらに、通常のクロバリーフ構造に近い tRNA^{Ser}_{UGA} を効率よくかつ正確に識別するために、Lys 93 が使われていることを本論文では考察している。

以上、本論文は mt SerRS の結晶構造解析及び構造に基づいた変異体解析を述べたもので、初めての哺乳動物のミトコンドリアのアミノアシル tRNA 合成酵素の立体構造の報告であり、さらに mt tRNA^{Ser} の認識の分子機構をも明らかにしている。

なお、本論文は、Mads Gravers Jeppesen 氏、鈴木 勉氏、Jens Nyborg 氏、渡辺公綱氏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（生命科学）の学位を授与できると認める。