

論文審査の結果の要旨

氏名 石井 亮平

tRNA は 5' および 3' 末端に伸長配列を持った長い前駆体 tRNA として転写される。前駆体 tRNA が成熟 tRNA になるために、この伸長配列は様々なリボヌクレアーゼの働きによって適切に除去 (プロセッシング) される必要がある。3' 末端伸長配列の除去は RNase E, RNase PH, RNase T, tRNase Z などの複数のリボヌクレアーゼが関与し、かつ生物種によっても異なる経路で行われる複雑な過程である。本論文ではこの 3' 末端伸長配列を除去する 2 つのリボヌクレアーゼ (RNase PH, tRNase Z) を対象として X 線結晶構造解析を行い、その反応機構と基質認識機構に関する研究を行った。RNase PH は真正細菌において、前駆体 tRNA の 3' 末端を CCA 末端までトリミングを行うエキソリボヌクレアーゼである。通常、リボヌクレアーゼは加水分解によって RNA を分解するが、RNase PH は無機リン酸を共基質とした加リン酸分解によって RNA を分解する。一方、tRNase Z は前駆体 tRNA を一般的に discriminator と呼ばれる 72 位の塩基の直下で切断するエンドリボヌクレアーゼである。しかし、高度好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 tRNase Z は前駆体 tRNA を CCA 末端 (76 位) の直下で切断するという異なった基質特異性を持つ酵素である。

第 1 章はイントロダクションであり、研究の概要と背景について述べられている。第 2 章は *Aquifex aeolicus* 由来 RNase PH の X 線結晶構造解析と変異体を用いた生化学的な解析について述べられている。論文提出者は RNase PH を大腸菌内で大量発現させ、精製、結晶化のスクリーニングを試みている。その結果、良好な結晶が得られ、セレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法により、共基質である無機リン酸との複合体の構造を分解能 2.3 Å で決定することに成功している。その結果、RNase PH は 6 量体のリング構造を取る事、共基質である無機リン酸は、2 量体によって形成された深いクレフトの奥に位置する事を初めて明らかにしている。RNase PH と同じ反応を触媒する PNPase の活性部位の構造と比較し、無機リン酸結合部位の認識方法の同異点について述べている。さらに、無機リン酸を認識している RNase PH

ファミリーに保存された3つのアミノ酸 (Arg86, Thr125, Arg126)をそれぞれアラニンに置換した変異体タンパク質を作成し, *in vitro* での RNA 分解反応実験やゲルシフト法による tRNA との結合実験を行っている. その結果から, これら3つのアミノ酸はどれも, RNase PH の活性に重要であることを明らかにしている. また, 変異体の活性の違いから, RNase PH の活性におけるそれぞれのアミノ酸残基の約割について推定している. さらに活性部位が深いクレフトの奥に位置することが, RNase PH の基質認識に重要である可能性を結合モデルから指摘している.

第3章は *Thermotoga maritima* 由来 tRNase Z の X 線結晶構造解析について述べられている. 論文提出者は tRNase Z を大腸菌内で大量発現させ, 精製, 結晶化のスクリーニングを試みている. その結果, 良好な結晶が得られ, セレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散法により, 分解能 2.6 Å での構造決定に成功している. その結果, tRNase Z は 2 量体で存在し, 保存されたヒスチジン残基, アスパラギン酸残基によって活性部位が形成されていることを明らかにしている. 論文申請者は活性部位の構造を同じスーパーファミリーに属する metallo- β -lactamase と比較し, 金属イオンの配位の仕方が異なることを指摘している. また, タンパク質表面の片面に正電荷が, もう片面に負電荷が分布していることから, この負電荷の面に tRNA が結合するのではないかと推測し, さらに報告されている生化学的な実験と合わせて tRNA との結合モデルを提案している. この結合モデルは *T. maritima* tRNase Z が他の生物種由来の tRNase Z と異なる基質切断部位を持つことをうまく説明することが可能である.

第4章は第2章および第3章の結果から, 既知の RNase の反応機構と比較して共通点と相違点について記述してある. また, 他の tRNA プロセシング酵素と比較し, 基質認識機構の多様性について考察している.

なお, 本論文第2章は, 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) との共同研究であるが, 論文提出者が主体となって分析およ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.