

論文審査の結果の要旨

氏名 小林 隆嗣

本論文は4章からなる。第1章は、イントロダクションであり、遺伝暗号の拡張に関する研究の歴史と背景に触れ、遺伝暗号の拡張の鍵となるアミノアシルtRNA合成酵素について解説している。そして、本論文の主対象となっているチロシルtRNA合成酵素 (TyrRS) の立体構造解析と遺伝暗号の拡張への応用について、生物種間のTyrRS・tRNA^{Tyr}の直交性と、非標準アミノ酸に対する特異性の獲得が、遺伝暗号の拡張に不可欠な要素であることを詳細に解説し、それらの分子基盤の理解のための立体構造解析が重要であると提起している。第2章は、古細菌*Methanocaldococcus jannaschii*由来TyrRSと、その対応するtRNA、基質であるチロシンとの三者複合体の立体構造解析について述べている。論文提出者は、*M. jannaschii* TyrRS・tRNA^{Tyr}・チロシン複合体の立体構造を1.95 Åという高分解能で決定した。そして、既に構造決定されていた真正細菌TyrRSとtRNA^{Tyr}との複合体の立体構造と比較することにより、それらの中でtRNAアクセプターアーム末端部が全く異なった残基と水素結合様式によって認識されていることを示し、直交性の構造的基盤を明らかにしている。tRNAアンチコドンの認識についても、両方で全く異なった認識様式をとるという新しい知見が得られている。さらに論文提出者は、その構造情報を利用して、遺伝暗号の拡張に用いられるサプレッサーtRNAを強く認識する新規変異体の作成に成功している。また、tRNA認識とアミノ酸認識を改変した各変異体のモデルを作成し、それぞれの認識機構を考察している。第3章は、3-ヨードチロシンを選択的に認識する大腸菌TyrRS変異体の基質認識機構の解明と、それに付随して明らかにされた、TyrRSのアミノ酸活性化反応における構造変化について述べている。論文提出者は、野生型TyrRSの触媒ドメイン (TyrRS Δ C) と、反応中間体のアナログであるTyr-AMSとの複合体の立体構造を決定し、(株)万有製薬つくば研究所で決定されたTyrRS Δ C・チロシン複合体の立体

構造と比較することにより，従来の構造解析では見いだされなかった，KMSKSループの新しい立体配置を発見している．このループは，先行研究によってアミノ酸活性化反応に重要な役割を持つことが知られていたが，本論文で，ループがATPの結合と反応の進行に伴った3つの立体配置をとることによって反応が進行することが初めて明らかにされた．次に，3-ヨードチロシン選択的な変異体である 37V195C変異体と3-ヨードチロシンもしくはチロシンとの複合体の高分解能立体構造を決定し，野生型の基質認識と比較を行っている．先行研究で得られた変異体のほか，新たな変異体を作成し，各基質に対する活性測定を行っている．さらに，195番残基の役割を明らかにするために，4種類の変異体を作成し，それぞれ，3-ヨードチロシンもしくはチロシンとの複合体の立体構造解析と基質結合部位の比較を行っている．それらの結果より，37V195C変異体の3-ヨードチロシンの特異的な認識のために，Val37とCys195はそれぞれ3-ヨードチロシン認識の獲得とチロシンの排除という異なった役割を担っていることを，原子レベルで初めて解明している．第4章は，総合的な討論と，今後期待される研究課題，結論が記されている．その中で，TyrRSのCCA末端の認識について，新しい仮説を提示している．また，古細菌TyrRSと真正細菌TyrRSのドメインを入れ替えることによって，遺伝暗号拡張のための新しいキメラ酵素が作成できる可能性について示唆している．

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），坂本健作助手（現・理化学研究所・チームリーダー），石谷隆一郎博士（現・東京大学・特任助手），EMBL（フランス）のStephen Cusack博士，Anna Yaremchuk博士，Michael Tukalo博士との共同研究である．また，第3章は，横山茂之教授，坂本健作助手，万有製薬つくば研究所の西村暹博士（現・筑波大学・監事），滝村哲雄博士，鎌田健司博士，Vincent P. Kelly博士（現・Trinity Collage Dublin，アイルランド），Ryo Sekine氏（現・Etagon社，アメリカ）との共同研究である．しかし，それらいずれも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。