

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 竹下 大二郎

本論文では、RNA が関与する生命現象である『RNA interference (RNAi)』と『テロメア伸長反応』に関わるタンパク質の X 線結晶構造解析および生化学的解析について述べている。本論文は、第 I 章『ヒト Dicer RNase III ドメインの X 線結晶構造解析』と第 II 章『ヒト EST1A PIN ドメインの X 線結晶構造解析』の 2 章からなる。

第 I 章では、Dicer の RNase III ドメインの結晶構造解析および生化学的解析について述べている。RNAi は、二本鎖 RNA を細胞内に導入することにより誘導される遺伝子発現の制御機構であり、真核生物で広く保存されている。将来的には、遺伝子治療につながる反応機構であると期待されている。Dicer は、この RNAi 反応過程において第一段階で働く酵素であり、長い二本鎖 RNA を分解する。本研究では、この二本鎖 RNA 分解に関わる RNase III ドメインの結晶構造を 2.0Å 分解能で決定し考察している。Dicer 中には RNase III ドメインが二つ含まれるが、これまではこの二つのドメインは分子内でダイマー化し活性を発現すると考えられている。本研究では、C 末端側の RNase III (RNase IIIb) について安定なタンパク質を調製することが可能となり解析を行ったが、この RNase IIIb でも安定なダイマーを形成していることが明らかになった。このホモダイマー中には、四つのマグネシウムイオンが結合していた。高分解能で四つのマグネシウムイオンが結合した RNase III 構造が初めて得られた。Dicer の RNase III ドメインに含まれるインサートモチーフは、活性部位を囲むように構造をとっていた。さらに生化学的な解析によって、この RNase IIIb が二本鎖 RNA 切断活性をもつことを示している。またこの切断反応によって、他の RNase III 酵素で見られる産物構造である 2 塩基 3' 突末端を生じることも示している。この特徴的な酵素反応を基にして、二本鎖 RNA と RNase IIIb との複合体モデルを構築している。このモデルによって、新たに見られたマグネシウムイオンが RNA の 2' ヒドロキシル基と結合することが示唆している。

第 II 章では、EST1A の PIN ドメインの結晶構造解析について述べている。EST1A タンパク質はテロメアの維持に関わる酵素、テロメラーゼホロ酵素に含まれる因子である。テロメアおよびテロメラーゼは、細胞のガン化、老化などと密接に関係しており、医学的な見地からも重要なターゲットである。酵母ホモログである Est1 タンパク質は、テロメラーゼ活性における必須因子であり、ヒトでも同様の役割を担っている可能性がある。そのタンパク質の立体構造を解明することは、SBDD (Structural Based-Drug Design) を適用する際に有効である。本研究では、ヒト EST1A の PIN ドメインの結晶構造を 1.8Å 分解能

で決定し、その構造の考察について述べている。この結晶構造から、5'ヌクレアーゼファミリーに属することが示された。しかしながら、これまで明らかになっている好熱菌 PIN ドメインの構造とは異なり、伸長した構造を見出されている。この立体的に異なる構造は、タンパク質の進化を考える上で興味深い知見である。EST1A ファミリーの PIN ドメイン中で高く保存された残基をタンパク質表面で解析した結果から、活性に重要な残基がヘリックス端で形成されるポケットに集中していることを示している。このポケットは推定活性部位であり、好熱菌の PIN ドメインの活性部位と一致していた。この部位はアスパラギン酸、グルタミン酸で構成される酸性残基クラスターを形成しており、また 5'ヌクレアーゼファミリーで活性に重要であると示されている S/TxD モチーフを構成する残基も保存されて空間配置されていることが示された。この PIN ドメインの生化学的な解析を *in vitro* で行ったがヌクレアーゼ活性は見出せなかった。この構造上の知見と異なり PIN ドメインが不活性化していることから、この PIN ドメインが核酸結合領域を欠損していることが示唆されている。本研究で明らかになったヒト PIN ドメインの結晶構造は、テロメラーゼホロ酵素の中で初めての立体構造である。テロメラーゼは、ガン細胞の異常な分裂を抑制する際の標的因子として考えられ、その阻害剤研究が盛んに行われている。本研究によって、PIN ドメイン立体構造を基にテロメラーゼ活性を高効率で抑制する低分子薬剤設計の基盤が構築できたと言える。

以上、本研究で得られた知見は、学術上貢献するところ大であると考えられる。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のあるものと認めた。