

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高橋 一敏

---

生命現象は、構成する因子間の特異的相互作用から成り立っている。こうした相互作用の特異性を決定する仕組みを明らかにすることは、生命の素反応を理解する上で重要である。本研究は、tRNA を特異的に切断するリボヌクレアーゼとして、大腸菌が生産するコリシン D、および酵母 *Kluyveromyces lactis* が生産する zymocin の基質認識機構を明らかにすることを目的とした。本論文では、コリシン D の活性ドメインである D-CRD 単体の立体構造を明らかにすると共に、生化学的実験、計算機を用いたシミュレーションによって、コリシン D の立体構造に基づいた、tRNA の特異的認識及び切断反応の機構を明らかにした。また、zymocin の触媒に関与するアミノ酸を推測すると共に、その免疫性が Immunity タンパク質の直接結合によることを明らかにした。さらに、zymocin との相同性から、酵母 *Pichia inositovora* が生産するキラートキシンが RNase である事を発見した。本論文は序章、および7章よりなる。

序章では研究の背景と目的を論じている。1章では、D-CRD 単体の立体構造を明らかにした。すでに、D-CRD/ImmD 複合体の立体構造を得ていたが、D-CRD が、特異的阻害タンパク質 ImmD との結合により構造変化を起こす可能性が考えられた。しかし、実際に得られた D-CRD 単体の立体構造は、D-CRD/ImmD 複合体中の D-CRD とほぼ同一であった。

2章において、コリシン D の tRNA 切断活性 (tRNase 活性) にとって重要なアミノ酸を、立体構造をもとに推測し、殺菌活性試験によりそれらのアミノ酸の重要性を評価した。また、コリシン D の tRNase 活性の pH 依存性を測定した。これらを踏まえて、Lys608 が一般酸触媒であり、His611 が一般塩基触媒であると推定した。

3章において、D-CRD/基質 RNA 複合体の結晶化の試みを論じている。現段階ではその結晶が得られていないため、D-CRD/基質 RNA 複合体の立体構造は明らかになっていないが、試みの過程で得られたコリシン D の基質認識における特徴を述べている。

4章において、D-CRD と基質 RNA を計算機上で組み合わせたドッキングモデルを構築した。得られたモデルは、生化学的実験結果と矛盾しないものであり、さらに、分子動力学法による構造最適化により、基質 RNA の A38 が結合に際してフリップアウトし、コリシン D の Trp679 とスタッキングすることが推定された。これは生化学実験データをよく説明するものであり、これらをもとに、コリシン D の反応機構モデルを提唱した。

5章および6章では、酵母 *K. lactis* が生産する tRNase である zymocin の  $\gamma$  サブユニット ( $KL_{\gamma}$ )、およびこれとの配列相同性から tRNase であると予測された、酵母 *P. inositovora* が生産するキラートキシンの  $\gamma$ -like サブユニット ( $PI_{\gamma}$ ) の、酵素学的解析を行った。まず、5章において、 $KL_{\gamma}$  の大腸菌での発現系を構築し、結晶化に取り組むとともに、触媒残基を推定して tRNase 反応機構を提唱した。また、zymocin 生産菌が zymocin で死なないための

免疫遺伝子は予め知られていたが、その産物である Immunity タンパク質を精製し、これが  $KI_{\gamma}$  の阻害タンパク質として機能することを証明した。6 章では、 $PI_{\gamma}$  の大腸菌での発現系を構築し、得られた  $PI_{\gamma}$  の機能解析を行い、 $PI_{\gamma}$  が UU 配列を標的とするリボヌクレアーゼであることを明らかにした。また、 $KI_{\gamma}$  と  $PI_{\gamma}$  のアミノ酸配列比較を行うことで、 $PI_{\gamma}$  の触媒残基を推定した。

7 章では、以上の総括を行い、今後の研究の発展性について議論した。また、キラーチンシンとしての tRNase が、高い基質特異性を獲得した原因を考察している。

以上、本論文は、原核生物と真核生物にわたる新しい機能ファミリーである、tRNA 特異的リボヌクレアーゼおよびその類縁リボヌクレアーゼについて、構造情報をもとにしたそれぞれの基質特異性と酵素反応機構を明らかにしたものである。これらの知見は、学術上、また応用上きわめて価値の高いものであり、審査委員一同は本論文が博士（農学）に値するものと認めた。