

氏 名	おおき やすし 大 木 靖
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2552 号
学位授与の日付	平成 14 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
学位論文題目	テトラヒメナグループ I リボザイムのフォールディング過程の解析

論文調査委員 (主 査)
教授 伊藤 維昭 教授 三木 邦夫 助教授 白石英 秋

論 文 内 容 の 要 旨

RNA は生体内において様々な役割を持つが、mRNA, tRNA, rRNA などに加え、酵素活性を持つ RNA (リボザイム) が存在する。リボザイムはタンパク質酵素と比較して少数のサブユニットで構成されているにもかかわらず、タンパク質酵素に匹敵する高度な機能と高い触媒活性を有する。リボザイムがその機能を十分に果たす為には、タンパク質酵素の場合と同様に、多くの高次相互作用を有した複雑な三次構造 (active form) を正確かつ速やかに形成する必要がある。従って active form が構築されていく仕組みの解析は、その機能発現メカニズムを知る上で重要である。申請者は、様々な ribozyme の中でも、反応機構及び構造が最も良く研究されてきた Tetrahymena group I intron の構造形成過程における律速段階、活性中心を含むコア領域内の分子間相互作用に注目し、RNA における構造形成と機能の関係について基礎的かつ総合的な知見を得ることを目的として、その active form 形成過程及びその過程での高次相互作用の役割の解析を進めた。

申請者は Tetrahymena group I ribozyme の段階的な folding (構造形成過程) における律速段階を調べるため、コア領域内 P3-P7 domain の構造形成の速度及び最終的なリボザイム活性を発揮するために必要な active form の形成速度を測定した。その結果、P3-P7 domain 形成は、active form 形成と比較して速く、律速段階は P3-P7 domain 形成後の active form への構造変換過程であることを明らかにした。

同 ribozyme の folding における律速段階は、active form への構造変化である。このことから、申請者は、コア領域内の P4-P6 及び P3-P7 間に形成される相互作用が folding において重要な役割を果たしていることを予想した。コア領域の相互作用としては、P4 X J8/7, P6 X J3/4, P4 X J6/7 が知られている。このうち P4 X J8/7 の folding における役割を解析し、P4 X J8/7 の形成は folding においては特別な役割を果たさず、active form を安定化することを示唆する結果を得た。P6 X J3/4, P4 X J6/7 は、triple helical scaffold と呼ばれ、P3-P7 形成の足場となる働きを担っていると考えられている。申請者はさらに、これらの folding における役割を解析し、J6/7 X P4 は P3-P7 domain 形成を、J3/4 X P6 は P3-P7 domain 形成後の active form への構造変換をそれぞれ誘導することを示し、J6/7 X P4 と J3/4 X P6 の folding における役割は独立しているとの結果を得た。これらは、三つの base triple が、ribozyme の活性中心を形成・維持するために、それぞれ独立の役割を担っていることを示す。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Tetrahymena group I ribozyme の活性中心を含むコア領域は、P3-P7 と P4-P6 の 2 つのヘリックス様ドメインから構成されている。両者は 1 本鎖領域や複数の 3 重鎖 (base triple) によって接続されており、これら group I intron において保存された base triple がコア領域の高次構造形成に重要な役割を果たしている。

同 ribozyme が活性を発現するには、複雑な 3 次構造である active form が、正しく形成される必要がある。大部分の分子においては、段階的に、まず、P4-P6 domain の二次構造が形成され、続いて、その三次構造である中間体 I2 が形成さ

れる。さらに I2 は I3 を経て、構造形成の終了した P3-P7 domain を含む中間体 IF の形成を経て、最終的には IF の立体構造変換により active form を形成する。しかし、活性中心の形成に重要な IF から active form への構造変化、及び folding を阻害する kinetic trap の実体については不明であった。申請者は、コア領域内の分子間相互作用と同 ribozyme の folding における律速段階、構造形成および機能の関係を解析した。

従来、Tetrahymena group I ribozyme の folding における律速段階は、P3 のミスベアリングによって生じるステム構造である alt-P3 から、正常なステム構造 P3 への変換の過程にあるとされていた。申請者は、このことの実偽を明らかにするため、P3-P7 domain 形成速度及び active form 形成速度を測定した。その結果、正常な P3 を含む中間体 IF から active form への変換過程に、律速段階があることを明らかにし、alt-P3 は律速段階ではないことを示した。また、この律速段階は、反応系に存在するマグネシウムイオンの濃度に強く影響されることを明らかにし、さらに正常な P3 を野生型のもの以上に安定化すると、他の folding の経路での構造形成が著しくなることを示した。

コア領域内での group I ribozyme に共通する、base triple として、P4 X J8/7、P6 X J3/4、P4 X J6/7 が知られている。申請者は、その変異体を用いて P4 X J8/7 の folding における役割を調べた。その結果、P4 X J8/7 の形成は、folding においては特別な役割をもたず、ribozyme の active form を安定化することを示した。P6 X J3/4、P4 X J6/7 は、triple helical scaffold と呼ばれ、P3-P7 形成の足場となる働きを担っていると考えられている。これらの folding における役割を、それぞれの変異体を用いて調べた結果、P4 X J6/7 は、P3-P7 domain の形成を、P6 X J3/4 は、IF から active form への構造変化を、それぞれ促進することが分かった。よって申請者はコア領域内の三つの base triple が、ribozyme の活性中心を形成・維持するために、それぞれ独立の役割を担っていることを示すことに成功した。

以上のことから、この申請論文は当該分野の研究の進展に寄与し、博士（理学）の学位論文として価値あるものと判定した。なお申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関する研究分野について試問し、合格と認めた。