

氏名	ないとうよしかず 内藤 義一
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2246号
学位授与の日付	平成12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	周辺構造 P5abc によるテトラヒメナイントロンの活性化機構の解析

論文調査委員 (主査) 教授 井上 丹 教授 伊藤 惟昭 教授 三木 邦夫
教授 齋藤 軍治

論文内容の要旨

原生物テトラヒメナの一種 *Tetrahymena thermophila* の rRNA 前駆体内に存在するイントロン RNA は、試験管内においてタンパク質の非存在下、自己を rRNA 前駆体から切り出す活性をもつ RNA 酵素(リボザイム)として知られている。この RNA の構造は基本骨格とその外側にある周辺構造から構成されている。その周辺構造のひとつ P5abc ドメインは、RNA が酵素活性を発揮するためには必須ではないが、このドメイン内の A-rich bulge, L5b, L5c という三つの部位がリボザイム内の他の領域と高次の相互作用を行い、リボザイムの活性化をすることが知られていた。しかし、これらがどのようにしてイントロンを活性化するのかが明らかではなかった。申請者は、このドメインを研究対象とし、RNA と RNA の高次の相互作用によるリボザイムの活性化のメカニズムの解明を行った。

申請者は、まず P5abc ドメインの A-rich bulge, L5b, L5c という三つの部位それぞれが、イントロンの活性化にどのように寄与するのかを調べるため、欠失変異体を作製し、これらによる高次相互作用が活性化に果たす役割を検討した。その結果、A-rich bulge の寄与が、活性化に際し最も大きいことを明らかにし、また他の二者もそれぞれ活性化に重要な役割を持つことを明らかにした。申請者は、さらに解析を進め、三者それぞれが他の二者に非依存的に独立してイントロンを活性化する能力を持つことを明らかにした。また、これら三者が基本骨格と RNA-RNA 相互作用において高い親和性を発揮することが、リボザイムの活性化に重要であることを示唆する結果を得た。

次に申請者は、これらの RNA-RNA 高次相互作用によるリボザイムの活性化に要求される構造単位の形成に必要な要素を明らかにするために、P5abc ドメインの P5b および P5c 領域を完全にランダムな配列で置換した変異体の集団から、*in vitro* selection 法を用いて活性の高いクローンを選択した。その結果、選ばれたほとんどのクローンは、野生型リボザイムの P5c に存在するループである L5c に酷似した塩基配列を持つこと、また P5c 領域と共通する二次構造を取りうることを明らかにした。またこの結果から、活性化に際し、P5c サブドメインに隣接する構造は特定のものである必要は無く、さまざまな形状のものでその機能を代替できることを予想した。この仮説に基づき、検討した結果、この部位に極端な人工的改変を行っても、高い活性を保持するリボザイムが存在するのを見出した。したがって、申請者は、P5c サブドメインに隣接する領域は、リボザイムを活性化するにあたり、様々な構造を受容できることを明らかとし、野生型の P5abc の構造は活性化の機能を果たすにあたり厳密に規定される必要が無く、さまざまな分子進化の対象となることを示した。一方、結晶構造解析によりこの P5c サブドメインの立体構造が知られていたが、L5c と相互作用をするリボザイム内の領域およびこの相互作用とリボザイムの活性発現との関係は不明であった、これに対し申請者は、選択されたクローンのランダム由来の配列の解析から、野生型のリボザイムにおいても P5c サブドメインの構造が L5c と L2 の相互作用において重要であることを強く示唆するとの結論を得ることに成功した。

論文審査の結果の要旨

RNA 酵素すなわちリボザイムは、生体内で最も基本的な生化学反応をになう重要な一群の RNA として知られており、その反応機構の解析がすすめられている。この RNA の構造は、活性中心を有する基本骨格とそれ以外の構造単位から構成される場合が多々ある。これらの構造単位には、基本骨格の構造の安定化および RNA 高次構造の形成を助ける働きをする事が知られている。申請者は、このような構造単位が、原生生物テトラヒメナ由来のセルフスプライシング機能をもつリボザイムの機能発現に際し、どのように働くのかを明らかにした。

原生生物の一種であるテトラヒメナのあるものの rRNA 前駆体のイントロン RNA は、自己を rRNA 前駆体から切り出す活性をもつリボザイムである。この RNA にある周辺構造のひとつ P5abc ドメインは、リボザイム活性を発揮するには必須ではない。しかし、リボザイムの他の領域と高次の相互作用を行い、その酵素活性を向上させることが知られていた。このドメインは触媒機能を司るイントロン本体から完全に独立した構造体である。そのため、この構造体は、(1)リボザイムの活性発現と構造との関係、またその活性化に果たす高次相互作用の役割を解析するすぐれた材料である。(2)リボザイムを物理的に分割し、このドメインを独立した RNA としてリボザイムの本体と分子間相互作用させることによりこれを活性化できるため、生体内で酵素機能を発揮するさまざまな RNA に見られる複数の RNA 分子の複合体形成による機能発現のメカニズムを知る上でよいモデルとなる。また(3)このドメインの構成は RNA 分子の進化の過程を反映している可能性があり分子進化的見地からも研究対象として興味深い。申請者は、これらを考慮し、このドメインを材料として、RNA-RNA の高次の相互作用によるリボザイムの活性化のメカニズムの解析を行った。

申請者の研究以前では、P5abc ドメインを構成する三つの部位 A-rich bulge, L5b, L5c とそれらを含む対応する三つの構造単位が、それぞれどのような仕組みでイントロンの活性化に寄与するのか不明であった。申請者は(1)三つの部位それぞれとリボザイム本体との RNA-RNA 相互作用が活性化へ寄与する度合いを調べ、まず(a)A-rich bulge が最も貢献度が高いこと、また(b)残りの二者も活性化に重要な役割を果たすこと、さらに(c)三者とそれを含む構造単位は、互いに物理的に独立した構造体としてイントロンを活性化する能力を有することを明らかにした。ついで(2)P5abc RNA とリボザイムの本体とに2分割された2分子から構成されるリボザイム複合体形成の解析により、複合体の安定性とリボザイムの活性化には相関関係がみられ、二分子の親和性の強さに比例してリボザイムの活性化の程度が決定される事を強く示唆する結果を得た。さらに(3) *in vitro* selection 法を用いた解析から、野生型のリボザイムにおいて、L5c が L2 と相互作用してイントロンを活性化すること、および、L5c 周辺の構造 (P5c サブドメイン) がこの場合は特に重要であることを強く示唆する結果を得た。また(4)リボザイムの活性化に際し、P5c サブドメインと P5a の間の構造には柔軟性があり、したがって、ここには特定の構造が要求されないことを予測し、この仮説を支持する結果を得た。

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される。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。