

氏 名	井 川 善 也
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	論 理 博 第 1387 号
学位授与の日付	平 成 12 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	グループIセルフ・スプライシング・リボザイムの周辺領域およびコア領域の機能と構造相関の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 丸 岡 啓 二 教 授 三 木 邦 夫 教 授 井 上 丹

論 文 内 容 の 要 旨

グループIイントロンは触媒活性を持つRNA(リボザイムと呼ばれる)である。このRNAは自身の触媒活性によって前駆体RNA中から切り出される。このRNAの二次構造は、中心にある完全に保存されている領域(コア領域)と、その外側にある個々のサブグループにのみ特徴的な領域(周辺領域)から構成されている。RNAの触媒活性を担う活性中心はコア領域に存在する。一方、周辺領域は、コア領域の構造を安定化することによりRNAの反応性を高める働きを担っている。申請者の研究以前には、コア領域中のどの部分が触媒活性を担っているのか、また周辺領域はどのようにしてコア領域の構造を安定化しているのかは不明であった。よって申請者は、これらを明らかにすることを目的に研究をすすめた。

まず、グループIイントロンの周辺領域がどのような構造および作用機構によってリボザイムの反応性を高めるのかを解明した。原生生物の一種であるテトラヒメナ由来のイントロンRNAを用いて研究を行い、その結果、同リボザイムの5'末端付近の領域に存在するP2.1と呼ばれる周辺構造を形成する一つの構造単位が、3'末端付近の領域に存在する別の周辺構造内の一つの構造単位であるP9.1と高次相互作用を行い、リボザイムの反応性を高めていることを明らかにした。さらにこのP2.1領域とP2領域を欠失させたリボザイムは、その触媒活性が極端に低下するが、これは別途合成したP2とP2.1領域のみからなるRNAを共存させることによって相補できることを示した。この結果は、RNAの5'末端付近の領域の周辺構造は、まとまった一つの構造ユニットとして、RNAの残りの部分との高次相互作用を介して会合し、触媒活性を効率良く発揮するために必要なRNAのコア領域の構造を安定化することを示す。

次に申請者は、グループIイントロンの周辺領域間の高次相互作用を利用して、触媒活性を担うコア領域の構造を保持するようデザインした、一連の欠失変異体を作成し、コア領域の解析を行った。コア領域はP4-P6およびP8-P3-P7と呼ばれる二つのヘリックス様の構造単位によって構成される。まずP8-P3-P7ヘリックス内のP8領域およびP8とP7を連結する一本鎖領域J8/7の解析を試みた。その結果、P8領域の全体、およびJ8/7のP8に隣接する5'側の領域2は活性発現に必須ではないことが解った。一方、J8/7のP7に隣接する3'側の領域は活性発現にきわめて重要であることを明らかにした。

次いで、コア領域を形成するもう一方のヘリックスP4-P6領域の欠失実験を、二種類の異なるイントロンを用いて試みた。その結果、P4-P6領域をすべて欠失させた場合でも、その活性は野生型のものと比べて約1000分の1ではあるが、どちらのイントロンも、本来、グループIイントロンが生体内で行う両スプライス部位でのリン酸基転移反応を、無触媒の状態に比べ10の8乗倍の加速効果を持って、正確に行えることが明らかになった。

これらは、グループIイントロンの触媒活性はコア領域中、P3とP7領域からなる単純な pseudoknot 型のヘリックス構造によって担われていることを示す。また、この結果は、現存するグループIイントロンの触媒ドメインを同定し、同リボザイムの先祖型RNAのモデルを提示する。

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 の一つであるグループ I イントロン RNA の構造は、活性中心を有する基本骨格および基本骨格の構造の安定化また RNA 高次構造の形成を助ける働きをするものにより構成される。申請者は、この RNA の 2 種類の構成要素が、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グループ I イントロン RNA の機能発現に際し、どのように働いている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 rRNA 前駆体にあるイントロン RNA は、自己を rRNA 前駆体から切り出す活性をもつ RNA 触媒（リボザイム）である。この RNA にある周辺構造は、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、その活性を向上させることが知られていた。

申請者は、まずこのリボザイムの周辺構造を形成する、ある一つの構造単位が、別の周辺構造内の一つの構造単位とそれまでに知られていなかった高次相互作用を行い、リボザイムの反応性を高めていることを明らかにした。また、この構造単位を含む周辺構造は、まとまった一つの構造ユニットとして、RNA の他の部分との高次相互作用を介して会合し、触媒活性を効率良く発揮するために必要な、RNA の基本骨格の構造を安定化することを示した。

次に申請者は活性中心を有する基本骨格の解析を行った。基本骨格は二つのヘリックス様の構造単位によって構成される。従来、この骨格は、RNA が活性を発揮するためには、不可分なものだと考えられていた。申請者は、グループ I イントロンの周辺領域間の高次相互作用を利用して、触媒活性を担うコア領域の構造を保持するようデザインした、一連の欠失変異体を作成し、コア領域の解析を行った。その結果、予想に反して、唯一つの構造単位のみで、生体内でグループ I イントロンが行う両スプライス部位でのリン酸基転移反応を、無触媒の状態に比べ 10 の 8 乗倍の加速効果を持ち、しかも、正確に行えることが明らかになった。

このことは、グループ I イントロンの触媒活性は、pseudoknot 型の単純なヘリックス構造をもつ小さな RNA によって担われていることを示す。また、この構造をもつ単純なリボザイムが、このリボザイムの先祖型 RNA である可能性を示唆する。従って、この申請者の研究は、リボザイムの成り立ち、分子デザイン、分子進化を考察する上で非常に興味深い事実を提示し、今後の課題であるリボザイムの活性中心そのものの解析に、またグループ I イントロンの構築原理の解明に貢献する重要な知見を提供したといえる。

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。