

Title	Structural and functional analysis of a novel and universal RNA degrading enzyme of <i>Thermus thermophilus</i>
Author(s)	石川, 大仁
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/58000
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	いし かわ ひろ ひと 石 川 大 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 23581 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Structural and functional analysis of a novel and universal RNA degrading enzyme of <i>Thermus thermophilus</i> (高度好熱菌由来の生物界に普遍的に存在する新規RNA分解酵素の機能構造解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 倉 光 成 紀 (副査) 教 授 福 山 恵 一 教 授 金 澤 浩 准教授 増 井 良 治

論 文 内 容 の 要 旨

RNAの分解とプロセッシングは全ての生物において必須であり、複数のRNaseやRNAヘリケースなどの酵素がその反応に関与している。大腸菌の系では、RNase Eが必須遺伝子であり、特に重要な役割を担っている。しかし、RNase Eのホモログは大腸菌近縁種の生物にのみ存在し、それ以外のほとんどの生物には存在しない。RNase Eを持たない多くの生物種では、 β -CASPファミリーに属するRNaseがRNA分解の中心的な役割を担っている可能性が近年になって示唆された。 β -CASPファミリータンパク質は、多くの生物種に保存された新規ヌクレアーゼである。*Thermus thermophilus* HB8のゲノムを探索したところ、TTHA0252とTTHA1140という2つのRNA分解 β -CASPファミリータンパク質を同定した。

まず初めに、TTHA0252の大量発現系および精製法を確立し、ヌクレアーゼとしての生化学的解析ならびに立体構造解析を行った。TTHA0252は様々なオリゴヌクレオチドに対して、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性とエンドヌクレアーゼ活性を示すことが明らかになった。また、TTHA0252はDNAよりもRNAをより効率的に分解し、2本鎖の核酸より1本鎖の核酸に対して強い活性を示した。さらにTTHA0252のX線結晶解析を行い、 β -CASPファミリーのタンパク質として初めての構造を2.8 Åの分解能で解くことに成功した。活性部位は2つのドメインの間の溝にあり、7つの保存された残基が2個の Zn^{2+} に配位した構造をとっていた。 Zn^{2+} やそれに配位する各残基の触媒機構における働きを推定するために、変異体を作製し、それぞれ活性測定及び立体構造解析を行った。その結果、触媒残基を同定し、 Zn^{2+} の役割を明らかにすることができた。エンドヌクレアーゼ活性のみを示す変異体では、宿主由来のRNAとの複合体構造が得られた。このことはTTHA0252が生体内でRNAを基質としている可能性を強く示唆した。さらに、野生型酵素とRNAアナログとの複合体の構造解析にも成功し、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示す分子機構を解明できた。

また近年の研究結果から、 β -CASPファミリータンパク質は、TTHA0252に似たグループとTTHA1140に似たグループの2つに明瞭に分けられることを明らかにした。TTHA1140に似たグループは、必須遺伝子であり、RNase EのようにRNA分解の主要な役割を担う可能性が強く示唆された。一方

TTHA0252 に似たグループは、ストレス条件化などで mRNA の分解にかかっていることが示唆された。

本研究によって、 β -CASP ファミリータンパク質の詳細な触媒機構を明らかにし、詳細なグループ分けをすることによって、多くの生物での RNA 分解系の手がかりを得ることができた。

論文審査の結果の要旨

申請者は、多くの生物に存在するものの、基質特異性が不明で機能未知のヌクレアーゼについて、高度好熱菌・TTHA0252タンパク質を研究対象として機能解析を行い、新規な RNA 分解酵素であることを明らかにした。また、基質や反応生成物との複合体の立体構造解析にも成功した。その結果、本酵素の触媒反応や基質特異性を理解することが可能になるとともに、その構造機能解析の結果から、RNA分解酵素群の新たな分類が可能になることも示した。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。