



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	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58000
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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 2 3 5 8 1 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 Zn²⁺ に配位した構造をとっていた。Zn²⁺ 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、Zn²⁺ 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。