

氏名(本籍)	おり た ま さ や (茨城県) 折田正弥		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第1,323号		
学位授与年月日	平成9年10月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Structural studies on functional RNAs by NMR spectroscopy (NMRによる機能性RNAの構造解析)		
主査	筑波大学教授	Ph. D. (理学)	多比良和誠
副査	筑波大学教授	農学博士	祥雲弘文
副査	筑波大学教授	理学博士	宗像英輔
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌

## 論文の内容の要旨

生体内においてRNAが持つ多様な機能はRNA自身が持つ複雑な高次構造に由来している。すなわち、RNAの機能発現メカニズムを解明するには、その立体構造を明らかにすることが必須である。本研究は機能解明を主たる目的とし、(1)ヒマ種子中に含まれる毒素タンパク質リシンの基質となるヘアピンループRNAおよび(2)ハンマーヘッド型リボザイムに対し、NMR(核磁気共鳴法)による立体構造解析を行ったものである。

リシンは、ヒマ(*Ricinus communis*)の種子に含まれる毒素成分で、機能の独立したA鎖とB鎖から成り、A鎖はリボゾームを不活性化する働きを持ち、B鎖はいわゆるレクチンである。リシンの作用部位は真核生物のリボゾーム中、28SrRNAの4324番目のアデノシンただ1ヶ所で、作用部位周辺のGAGA配列(太文字で示したアデノシンが4324番目の残基に相当する)のテトラループ構造がリシンにより認識される最小単位の基質RNA構造である。リシンはこのアデノシンの糖と核酸塩基の間のグリコシド結合を加水分解することによりリボゾームの蛋白質合成能を消失させ、その結果、細胞は死に至る。

リシンの認識する立体構造を明らかにするため、その基質となるGAGA配列のテトラループRNAのNMR解析を行った。NOE(核オーバーハウザー効果)から得られる原子間距離情報及びカップリング定数値から得られる二面角情報をもとにrestrained molecular dynamics計算によりGAGAループの三次元構造を決定した。その結果、リシンの作用部位に相当するループ中2番目のアデノシン残基が、ループのターン(折れ曲がり)構造に近接するため、空間的にループの頂上の部分に位置し、また、その5'側には大きなスペースが存在する事が明らかとなった。このスペースは作用部位に対するリシンの攻撃をより行い易くしていると推定される。リシンは真核生物のrRNA中に存在する約7000ヌクレオチド残基中、たった一ヶ所のアデノシンを認識し脱プリン反応を行う非常に厳密なRNA N-グリコシダーゼであるが、基質であるGAGAループの三次元構造もその厳密な認識に貢献していると推定される。

リボザイムはマグネシウムイオン等の二価金属イオン存在下において、部位特異的にRNA鎖を切断するRNA分解酵素である。ハンマーヘッド型リボザイムは数多く見いだされているリボザイムの中で、最も小さな活性ドメインを持つリボザイムの一つとして知られており、植物に感染するRNAウイルスに含まれる低分子RNAやウイロイドにおいて見いだされる。このハンマーヘッド型リボザイムのRNA鎖切断反応において、マグネシウムイオンが触媒として直接関与している事は周知の事実であるが、リボザイムの活性コンホメーションの形成や

その構造の安定化にはこれまでマグネシウムイオンは無関係であるとされてきた。

リボザイムとしての機能を持ち、かつ32残基から成る R32を、基質及びマグネシウムイオン非存在下において、塩基対の結合様式を NMR を用いて確認した。この R32リボザイムは kinetics を測定する条件下 (37°C, 25 mM MgCl<sub>2</sub>) において、不活性な複合体を形成することなく、基質を切断できる事が既に確認されていたが、NMR 解析は、(基質及びマグネシウムイオン非存在下において) R32が基質の配列を認識し塩基対を形成するはずの残基が分子内で塩基対を形成する不活性な状態で存在している事を明らかにした。また、マグネシウムイオン非存在下において、R 32に対し基質に相当する RdClI (R 32により切断を受けないように切断部位を通常のリボースからデオキシリボースに置換した11残基の基質) を加えたところ、R 32と RdClI の間には複合体は形成されなかった。これは R32自身の不活性なコンホメーションに由来すると考えられる。しかしながら、マグネシウムイオン存在下において同様の滴定実験を行ったところ、複合体の形成を示唆する NMR スペクトルの変化が観測された。これらの実験結果は、マグネシウムイオン非存在下において基質と複合体を形成できない不活性構造の R 32リボザイムが、マグネシウムイオンの働きにより、基質が認識できるコンホメーションへと変化できる事を示している。

## 審査の結果の要旨

本研究は、ヒマ種子中に含まれる毒素蛋白質リシンの基質となるヘアピンループ RNA およびハンマーヘッド型リボザイムに対し、その機能解明を主たる目的とし、NMR 解析を行ったものである。

リシンの基質となる GAGA 配列のテトラループ RNA の三次元構造決定から、リシンの基質確認にテトラループの特徴的な folding が重要であることを明らかにし、また、GAIA ループ (I: イノシン) のリシンによる切断反応が GAGA ループに比べ著しく遅くなる事から、脱プリン化を受けるループ中 2 番目のアデノシン残基と同じく、その 3'側のグアノシン残基もリシンの認識に重要であることを明らかにした。さらに切断部位のアデノシンをデオキシアデノシンに置換した GdAGA (dA: デオキシアデノシン) ループの切断速度が GAGA ループに比べ26倍向上する事を見出し、その NMR 解析も行った。

またさらに、ハンマーヘッド型リボザイムに対しても NMR 解析を行い、マグネシウムイオン非存在下において基質と複合体を形成できない配列を持つリボザイムが、マグネシウムイオンの働きにより、基質が認識できるコンホメーションへと変化できる事を明らかにした。この知見は、マグネシウムイオンにはこれまで知られていたリボザイムの切断反応における触媒としての役割以外にも、基質認識に重要な構造変化をリボザイムに引き起こす働きがある事を明らかにした最初の例となる。

本研究は、NMR により決定した三次元構造及び経時的なシグナル変化の追跡から、RNA の持つ機能を原子レベルで考察したものであり、RNA-蛋白質間の分子認識機構、あるいは RNA の機能発現とその動的な構造変化との関係解明の点において極めて意義深い成果である。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。