

2006年 1月 18日

環境・生命 工学専攻	学籍番号	971802
申請者氏名	安藤 智朗	

指導教員氏名	菊池 洋 平石 明 田中 照通
--------	-----------------------

論文要旨(博士)

論文題目	真正細菌リボヌクレアーゼPの基質認識に関する研究
------	--------------------------

(要旨)

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は転移 RNA (tRNA) 前駆体の 5'側の余剰な塩基配列を切断し、tRNA の 5'末端を成熟化させるプロセシング酵素である。また、真正細菌由来の RNase P の RNA サブユニットは単独で触媒活性を持つリボザイムであることが知られている。近年、試験管内条件下において、真正細菌の RNase P RNA が成熟した tRNA をつくるという通常の働きではなく、tRNA を成熟分子内で切断、破壊してしまうという異常反応を起こすことが明らかになった。さらにこの反応は、真正細菌 RNase P RNA が他のリボザイムとは異なり、基質 RNA の高次構造を認識し切断するという興味深い基質認識機構によるものであることが示された。

本研究では、真正細菌 RNase P の基質認識機構の詳細を明らかにするため、通常の基質切断と上記のような異常切断における基質認識を含めた反応機構の比較という観点から実験を行った。

まず、真正細菌 RNase P の試験管内条件下における tRNA 成熟分子内切断反応に関し、今まで報告されている *Drosophila melanogaster* 以外の種の tRNA を基質にした場合においてもこのような反応が起こるかどうかが検討した。その結果、*H. sapiens* tRNA<sup>Trp</sup> が tRNA 成熟分子内で切断されることを明らかにし、この反応が tRNA の普遍的にとるクローバーリーフ構造以外のヘアピン様の新たな二次構造を形成する tRNA に広く起こりうる反応であることを明らかにした。また、反応速度論的解析により、この反応における  $K_m$  はプロセシングのそれとほとんど同じであるのに対し  $k_{cat}$  は非常に小さいことが明らかになった。

次に、真正細菌 RNase P RNA が唯一、配列を認識する部位である tRNA の 3'末端塩基の認識について、クローバーリーフ型、ヘアピン型、2種の基質形状の違いという側面より解析を行った。真正細菌 RNase P の認識する、クローバーリーフ型、ヘアピン型、双方の基質形状をとる基質を用いた切断反応実験、反応速度論的解析の結果から、ヘアピン型基質における 3'末端塩基の認識がクローバーリーフ型基質のそれとは異なることを見いだした。

本研究ではまた、基質形状の認識に  $Mg^{2+}$  の及ぼす影響について検討した。切断反応実験より、クローバーリーフ型基質の切断の場合よりもヘアピン型基質の切断では高濃度の  $Mg^{2+}$  が必要であることが明らかになった。また、ヘアピン型基質を用いた反応速度論的解析から、 $Mg^{2+}$  はある濃度までは基質親和性を高めるが、過剰濃度では基質との親和性を妨げることで、 $Mg^{2+}$  濃度の上昇は酵素の切断活性の上昇に直接結びつくことが明らかになった。

以上のように、本研究では真正細菌 RNase P の基質認識が基質の形状により大きく異なることを明らかにするなど多くの知見を得ることができ、その反応機構の解明に大きく貢献することができた。今日までに、RNase P は他のリボザイムと同様に遺伝子発現制御への応用が試みられている。RNase P は基質の形状を認識して切断を行うことができるため、配列に依存せず標的を設定できるという他のリボザイムにはない利点を持っている。RNase P リボザイムによる遺伝子発現制御への応用に際して、標的配列をガイド配列により RNase P の基質となるような構造へと変化させることが必要不可欠であり、変化した構造は当然、純粋な tRNA 型とは異なった構造となるが、本研究の結果はこのような応用に関して、効率的なガイド配列の設計等、有用な知見をもたらすと考えられる。また、真正細菌 RNase P RNA やリボソーム RNA の高次構造認識能力は、数多くの RNA 酵素の存在していた原始の RNA world における RNA 分子の構造決定に重要な役割を持っていたと考えられ、tRNA をはじめとする RNA 分子が如何にして現在の構造へと進化したのかを知る大きな手がかりになると考えられる。このことから、本研究のような真正細菌 RNase P の基質認識に関する研究は、RNA world に関して考える際に新たな視点をもたらすことができるかもしれない。