

Study on the mechanism of substrate recognition by proteinaceous ribonuclease Ps in *Arabidopsis thaliana*

今井, 崇喜

<https://hdl.handle.net/2324/1654959>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏名	今井 崇喜		
論文名	Study on the mechanism of substrate recognition by proteinaceous ribonuclease Ps in <i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ由来リボヌクレアーゼP様タンパク質酵素 (PRORPs) の基質認識機構に関する研究)		
論文調査委員	主査	九州大学	教授 木村 誠
	副査	九州大学	教授 角田 佳充
	副査	九州大学	准教授 中村 崇裕

論文審査の結果の要旨

リボヌクレアーゼ P (RNase P) は前駆体 tRNA (pre-tRNA) の 5' 末端余剰配列を切断する RNA 酵素 (リボザイム) で、触媒活性を持つ RNA と補助因子であるタンパク質から構成されている。RNase P は全ての進化系統ドメインに見出されているが、植物や細胞内小器官ではその存在が不明であった。近年、シロイヌナズナに RNase P と同様の活性を持つタンパク質酵素・Proteinaceous RNase Ps (PRORP1、PRORP2、PRORP3) が発見され、リボザイムである RNase P とタンパク質酵素である PRORP の比較の観点から PRORP の構造とその触媒機構に興味を持たれている。本論文は、シロイヌナズナの葉緑体とミトコンドリアに局在している PRORP1 の基質認識機構について解析し、RNase P のそれと比較検討したものである。

PRORP1 は 572 アミノ酸から構成され、N 末端に RNA 結合モチーフである 5 つの Pentatricopeptide repeat (PPR) を持ち、C 末端に新規ヌクレアーゼドメインを有している。まず、N 末端から順次欠失した変異体を作成し、各 PPR モチーフの pre-tRNA^{Phe} 切断活性への関与を検討した。その結果、N 末端に位置する非 PPR 領域を欠失した変異体は切断活性を維持していたが、PPR1、PPR1-PPR2、および PPR1-PPR3 をそれぞれ欠失した変異体の切断活性は著しく低下していた。さらに、PPR2 または PPR3 のみを欠損した変異体の切断活性も検出されなかった。この結果から、PRORP1 の触媒活性には少なくとも PPR1、PPR2、PPR3 と pre-tRNA^{Phe} との相互作用が重要であることが分かった。

続いて、PPR モチーフの塩基認識コードに基づいて、各 PPR モチーフの認識塩基を予測したところ、PPR2、PPR3、PPR4、PPR5 がそれぞれ C、A、A、U を認識していることが予測された。この配列を tRNA^{Phe} の配列と比較したところ、T ループの C56-A57-A58-U59 とよく一致した。そこで、C56-U59 をそれぞれ他の 3 種の塩基に置換した変異体 pre-tRNA^{Phe} を作製し、PRORP1 による切断活性を検討した。その結果、C56、A57、A58 の変異体 pre-tRNA^{Phe} は PRORP1 によって切断されなかったが、U59 の変異体は切断された。このことから、PPR2、PPR3、PPR4 がそれぞれ C56、A57、A58 を認識し、PPR5 は塩基の認識に関与しないことが推定された。このことを確認するために、PRORP1 の PPR2、PPR3、PPR4 の塩基認識コードを構成するアミノ酸を置換した変異体 PRORP1 を作製し、同様に pre-tRNA^{Phe} 切断活性を検討した。その結果、PPR2 と PPR3 の変異体の切断活性は顕著に減少していたが、PPR4 の変異体の活性の低下は僅かであった。この結果から、PRORP1 の触媒活性には、PPR2 と PPR3 による C56 と A57 の認識が重要であることが示唆された。この認識機構を検証するために、PRORP1 と tRNA^{Phe} の高次構造に基づき、PRORP1-tRNA^{Phe} 複合体モデル構造を構築したところ、PPR2 と PPR3 の塩基認識コードを構成しているアミノ酸が、C56 と A57 を水素結合により認識しているモデル構造を作成することができた。

最後に、この PRORP1 の基質認識機構を RNase P のそれと比較したところ、リボザイムである RNase P が pre-tRNA^{Phe} の D ループの G19 と T ループの C56 をスタッキング相互作用により認識していることから、PRORP1 は RNase P とは異なる基質認識機構を持つことが示唆された。

以上要するに、本研究は pre-tRNA プロセッシングを触媒するタンパク質酵素・PRORP1 が、同一の反応を触媒するリボザイム・RNase P と異なった基質認識機構を持つことを示したもので、酵素化学および生物化学の発展に寄与する価値ある業績と認める。

よって、本研究者は博士 (農学) の学位を得る資格を有するものと認める。