

## 論文審査の結果の要旨

氏名 加藤めぐみ

本論文は4章からなる。序章はイントロダクションにあたり、本論文中で扱う核酸結合タンパク質についての概略および論文の概要、研究目的等が記述されている。第1章は tRNA に存在する修飾塩基ヒドロキシワイプトシンの生合成に関与する修飾酵素である TYW5 の結晶構造解析について述べられている。ワイプトシンは tRNA のアンチコドン近傍に存在する修飾塩基であり、翻訳の正確性に寄与している。高等真核生物の中には、ワイプトシンがヒドロキシル化されたヒドロキシワイプトシンの存在が知られており、新たに発見された蛋白質 TYW5 がその触媒活性を担う事が明らかになった。TYW5 はアミノ酸配列から、ヒストン修飾酵素等によく見られる jmjC ドメインを有する非ヘムヒドロキシラーゼに類似していると予想された。しかし、今まで jmjC ドメインを有するタンパク質がヌクレオチド鎖の認識に関わる報告はなく TYW5 はこの種のタンパク質でヌクレオチド鎖に結合する初めての酵素と予想された。本研究で論文提出者らは、大腸菌組換えタンパク質として発現させたヒト由来 TYW5 において構造決定に耐え得る結晶を得ることに成功し、さらにセレノメチオニン置換体を用いた多波長異常分散(MAD)法による位相決定を行ない、最終的に分解能 2.5 Å で全長構造を決定した。さらに、得られた結晶に対し 2-オキソグルタル酸と鉄イオンの代わりに阻害剤としてニッケルイオンを結晶に浸潤させ、補因子結合状態での構造を 2.8 Å 分解能で決定した。得られた構造は、C 末端のヘリックスバンドルを介した二量体を形成し、jmjC ファミリータンパク質に特徴的なβ-ジェリーロールコア構造を有していた。得られた構造から tRNA の認識に重要と予測されたアミノ酸や領域に変異を導入した変異体を作製し、LC/MS を用いた酵素活性測定及び tRNA 結合実験を行った。解析結果を基に tRNA と TYW5 のドッキングモデルを作成し、新規の tRNA 認識モデルを提唱した。この結果は、修飾塩基の発見以降 30 年間も未解明であった詳細なヒドロキシル化反応機構を明らかにするのみならず、jmjC ファミリータンパク質による初の核酸鎖認識機構に知見をもたらすものであり意義あるものと評価できる。

第2章では、ヒト由来 DDX41 の構造解析に向けた試みについて述べられている。DDX41 は DEAD-box 型ヘリケースに分類され、細菌感染の際に生じる cyclic-diGMP (c-diGMP) や cyclic-diAMP (c-diAMP) といった cyclic-di nucleotide (CDNs) を直接認識し自然免疫を惹起するパターン認識受容体であると報告された。DDX41 は細菌感染によって生じた c-diGMP を直接認識し、ER 上に存在する受容体 STING 依存的な経路を活性化し、I 型インターフェロンの産生に関与することが報告されていた。さらに、DDX41 は細胞内 DNA の感知に関与する可能性も示唆されている。しかし、DDX41 による CDNs 認識機構及びシグナル伝達反応機構については未解明のままであった。そこで本研究で論文提出者は、これら諸問題を解明するために DDX41・c-diGMP 複合体の X 線結晶構造解析を目指し研究を行

った。ヒト由来 DDX41 のコンストラクトの改変及び発現・精製系の確立を行い，得られたタンパク質を用いて c-diGMP との複合体の結晶化スクリーニングを行った。最終的にヒト由来 DDX41 DEADc ドメインにおいて分解能 3 Å を超えるデータセットを与える結晶を得た。本研究の中で論文提出者は，結晶構造解析に不可欠な結晶化試料の安定的な調製を可能にした。これらの結果は今後の DDX41 の構造解析ひいては CDNs による自然免疫惹起の構造基盤の解明に大きく貢献することが期待されるものでもある。終章には論文全体の総括が記述されている。

なお，本論文第 1 章は，荒磯裕平・野間章子・長尾翌手可・鈴木勉・石谷隆一郎・濡木理との共同研究であるが，論文提出者が主体となって，TYW5 の構造解析及び機能解析を行ったもので，論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって，博士（理学）の学位を授与できるものと認める。