

論文審査の結果の要旨

氏名 松本直樹

本論文は全四章から構成される。

序章はイントロダクションにあたり、高等真核生物の生殖巣に備わる piRNA 経路を含めて RNA サイレncing機構についての概略および研究目的等が述べられている。

第一章は piRNA 経路因子 Maelstrom の構造機能解析について述べられている。Maelstrom (Mael) は一本鎖 RNA に結合する HMG ドメインと機能未知の MAEL ドメインからなるタンパク質であり、piRNA を介したトランスポゾン抑制や piRNA 産生にかかわる。本研究で論文提出者は、大腸菌組み換えタンパク質として発現させたショウジョウバエ由来 Maelstrom の MAEL ドメイン (DmMAEL) の結晶構造を内在の亜鉛原子の異常散乱効果を用いた単波長異常分散法により分解能 1.6 Å で決定した。DmMAEL の結晶構造から、DmMAEL は RNase H 様フォールドをとるが、触媒モチーフである DEDDh モチーフは失われていることを明らかにした。その上で生化学的解析を行った結果、MAEL ドメインは一本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼであること、MAEL ドメインはグアニン残基に対して切断嗜好性を示すこと、MAEL ドメインの RNA 切断活性は種をこえて保存されていることを明らかにした。また立体構造や一次配列保存性を基に変異体を複数作成し、DmMAEL において RNA 切断に関与するアミノ酸残基を複数同定しており、これらの結果から MAEL ドメインは新規のヌクレアーゼであると結論づけている。さらにショウジョウバエ卵巣生殖系列体細胞由来培養細胞 (OSC) を用いたレスキューアッセイを行い、DmMAEL の RNA 切断活性は OSC におけるトランスポゾン転写抑制には関与しないであろうと結論づけている。その上で Mael がトランスポゾン抑制や piRNA 産生にどのように関与するか、その分子メカニズムについての考察が述べられている。さらに MAEL ドメインの触媒部位について、進化的な観点から考察されている。これらの結果は、これまでその機能が不明であった Mael に関して新たな知見をもたらすものであり意義あるものと評価できる。

第二章は piRNA 経路の中核因子 PIWI サブファミリータンパク質の結晶構造解析について述べられている。RNA サイレncingにおいて小分子 RNA と結合しエフェクター複合体を形成する Argonaute は AGO サブファミリーと PIWI サブファミリーに分類される。これまで PIWI サブファミリータンパク質の調製は困難とされてきたが、本研究で論文提出者は良質なモノクローナル抗体を用いることで生体試料から PIWI サブファミリータンパク質を高純度に精製する系を確立した。さらにカイコ卵巣生殖細胞由来培養細胞 BmN4 から精製した Siwi の結晶化に成功し、その結晶構造をヒト由来 Ago2 (hAgo2) などの構造情報をもとに分子置換法により決定した。Siwi は BmN4 内在発現性の piRNA と結合した状態で精製されており、Siwi と piRNA 間の相互作用が述べられている。また Siwi と hAgo2 の結晶構造を比較することで、N ドメインと PAZ ドメインが大きく異なる立体配置をとる

ことを明らかにした。この N ドメインの立体配置の違いが AGO サブファミリータンパク質に特異的に存在する挿入領域に由来することを示している。さらに N ドメインの立体配置の違いが核酸結合チャネルの違いを生み出すことで PIWI サブファミリータンパク質に特有の機能をあたえる可能性について論じている。加えて Siwi-二本鎖 RNA 結合モデルを作成し、Siwi による標的 RNA の抑制機構についてモデルを提唱している。これらの結果は今後の PIWI サブファミリータンパク質の構造解析ひいては PIWI タンパク質によるトランスポゾン抑制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ある。

終章には論文全体を通して総括が述べられている。

なお、本論文第一章は佐藤薫、西増弘志、難波祐里香、宮首佳奈、堂前直、石谷隆一郎、塩見春彦、塩見美喜子、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実験および考察を行ったものであり、論文提出者の寄与は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と認める。