

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 花田孝雄

本論文は、動物ミトコンドリアに存在する特異構造をもつ tRNA の翻訳機能を、ウシ・ミトコンドリアのイン・ピトロ翻訳系を用いることにより、明らかにしたものである。

第 1 章では、本研究の背景を述べた。通常のクローバーリーフ構造とは大きく異なる 2 次構造をもつ tRNA が動物ミトコンドリアには多く存在するが、特に後生動物においてはセリンに対応するコドン AGY(Y は U または C) を翻訳する tRNA^{Ser}_{GCU} は D アーム部位を殆ど欠くという顕著な特徴をもっている。このような不完全な tRNA が果たして正常な tRNA と同様に機能するか否かは、tRNA の構造—機能相関の観点から大変興味深い問題である。しかしこれまではこの異常な tRNA^{Ser}_{GCU} の立体構造とアミノアシル化活性については調べられてきたが、その翻訳機能に関してはミトコンドリアのイン・ピトロ翻訳系を構築することが困難であったため、全く調べられていなかった。最近になって申請者の所属研究室でこの問題を解決した経緯を述べ、特異構造をもつ tRNA の翻訳機能の解析から tRNA の構造と機能の関係について新しい知見が得られる可能性に言及した。

第 2 章では、ウシミトコンドリアと大腸菌のイン・ピトロ翻訳系を構築するために必要な伸長因子 (EF-Tu, EF-Ts, EF-G) とリボソームの調製法について述べ、アッセイを簡便化するために、アンチコドンとアミノ酸受容システムに変異を導入し、ポリ (U) を鋳型とし、ポリ (アラニン) 合成を行うことのできるイン・ピトロ転写による tRNA の調製法と、アミノアシル-tRNA の精製法について述べた。

第 3 章では、本研究で用いた、イン・ピトロのポリ (U) 依存ポリ (アラニン) 合成反応、逆相カラムを用いた HPLC での生成ペプチドの解析、ゲルシフトアッセイによるアミノアシル-tRNA と EF-Tu との結合能評価、リボソームへのアミノアシル-tRNA の結合実験、ペプチド転移反応、リボソーム上での tRNA 転位反応等の実験方法について述べた。これらの実験により得られた結果から何が明らかになり、tRNA の翻訳能がどのように評価できるかについて述べた。

第 4 章では、ウシミトコンドリアと大腸菌からのリボソームと伸長因子の調製法と、転写合成による tRNA の調製法について述べ、これらを用いた翻訳実験の結果について記述した。すなわち、ウシ肝臓より調製した伸長因子 (EF-Tu, EF-G) とリボソームを用いてポリ (U) 依存ポリ (アラニン) 合成反応を行い、D ループの欠けた tRNA^{Ser}_{GCU} はクローバーリーフ型をとる tRNA^{Ser}_{UGA} と比べて翻訳活性がかなり低いことを見出した。大腸菌のリボソームを用いた場合でも同様の結果を得たことから、tRNA^{Ser}_{GCU} の低い翻訳活性はリボソームに由来するものではなく、tRNA 自身に起因することがわかった。HPLC を用い

て生成ペプチドの解析を行ったところ、 $tRNA^{Ser}_{GCU}$ による合成反応ではアラニンの 4 量体までは生成するがそれ以上長いペプチドは生成しないことが分かった。さらに詳細に翻訳反応の素過程についての解析を行った。まずアミノアシル-tRNA と EF-Tu、GDPNP との 3 者複合体形成能をゲルシフト・アッセイで調べたところ、 $tRNA^{Ser}_{GCU}$ 複合体の解離定数は $tRNA^{Ser}_{UGA}$ のその 2 倍程度に過ぎなかった。リボソームを用いた非酵素的な結合実験により、リボソームの P サイトに対する結合能は $tRNA^{Ser}_{GCU}$ 、 $tRNA^{Ser}_{UGA}$ ともに同程度であったのに対して、A サイトに対する結合能は $tRNA^{Ser}_{GCU}$ が著しく低いことが明らかとなった。EF-Tu 依存のアミノアシル-tRNA の A サイトに対する結合実験でも $tRNA^{Ser}_{GCU}$ の結合能が $tRNA^{Ser}_{UGA}$ のそれより著しく低いという結果が得られた。これらの結果より、 $tRNA^{Ser}_{GCU}$ の A サイトへの結合能が低いことが翻訳能の低下の原因であることが示唆された。さらにリボソーム上でのペプチド転移反応と転位反応についても解析を行ったが、 $tRNA^{Ser}_{GCU}$ と $tRNA^{Ser}_{UGA}$ で顕著な差は観測されなかった。以上の結果より D ループの欠けた $tRNA^{Ser}_{GCU}$ の翻訳能の低下はリボソームの A サイトに対する結合能が低いことに起因すると結論づけられた。

第 5 章では、以上の実験で得られた知見を総合して特異構造をもつ tRNA の翻訳機能について考察した。特に、D アームを欠く $tRNA^{Ser}_{GCU}$ はそのアンチコドンシステムがリボソーム小サブユニットの A サイトに位置する際に、おそらく D アームの欠如に起因して、tRNA のリボソームへの結合能が低くなる可能性を指摘した。また、ミトコンドリアではこのような特異構造をもつ tRNA が翻訳の調節因子として働いている可能性と、殆どすべての tRNA に保存されているクローバリーフ型構造が通常の翻訳系における翻訳反応の均一性を維持している可能性とを指摘し、これらを検証するための実験系について考察した。

以上、本論文は動物ミトコンドリアの特異構造をもつ tRNA の翻訳機能をイン・ビトロの翻訳系を用いて詳細に検討したものであり、この研究により、翻訳過程でのアダプター分子としての tRNA の構造—機能相関に関する新しい知見と、tRNA が翻訳機能を発現するための最少必須構造に関する有益な示唆が得られた。これらは翻訳機構の分子基盤の解明に貢献するばかりでなく、RNA 機能に必要な構造に関する知見を提供した点で RNA 工学に資するところも大である。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。