

## 審査の結果の要旨

氏名 藤原俊伸

本研究は、成熟ペプチド鎖合成後に残るリボソーム、mRNA、tRNA からなる複合体を解体し、各々を再生する反応過程を触媒する中心的タンパク質因子であるリボソーム再生因子 RRF の作用機構を分子レベルで解明することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. RRF 遺伝子の高温致死性大腸菌株を分離し、*in vivo* 機能評価系を確立した。これにより、様々な RRF 変異体の活性評価を簡便に行い、かつスクリーニングを行うことが可能になった。次に、本研究以前に報告されている様々な生物由来 RRF のアミノ酸配列を比較検討し、C 末端領域にタンパク質因子や RNA と相互作用に関わりうる荷電アミノ酸が集中することを見出した。そこで、C 末端領域が機能上重要な役割を果たしているのではないかと予想し、RRF 分子の C 末端からの系統的な欠損変異体シリーズを作成し、失活したものの中で最も表現系の閾値が復帰変異体の遺伝学的選択に有利と考えられる 9 アミノ酸残基欠損体 (RRF $\Delta$ C9) に、PCR で変異を導入することで復帰変異体の分離を試みた。その結果、数百の復帰変異体を得た。そして、これらのうち幾つかは C 末端に隣接し、 $\alpha$ -helix 構造をとることが強く予想される領域に集中することを見出した。
2. 得られた変異の機能的意義を明らかにするために RRF タンパク質分子の立体構造の解明が必須と考え、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 RRF 遺伝子のクローニング、および過剰生産精製系の確立を行った。DNA 塩基配列決定の結果、高度好熱菌 RRF はアミノ酸レベルで大腸菌 RRF と比較的高い相同性を示した。そして、構造生物学グループとの共同研究による構造解析の結果、RRF は 2 ドメインで構成され、形状、サイズとも tRNA と酷似する tRNA 擬態分子であることが判明した。
3. 遺伝学的実験で得られた情報を RRF の立体構造に対応づけた結果、復帰変異体の

変異導入部位が担う機能が一目瞭然となり、RRF の tRNA 擬態性に関して非 tRNA 的側面と tRNA 的側面の双方で重要な知見を得た。特に、復帰変異は tRNA 擬態分子 RRF の特徴的な 2 ドメインの先端に集中し、これらの部位は tRNA のアミノ酸受容部位 (CCA 末端)、アンチコドン部位に相当することが示された。

4. 復帰変異が局在する立体構造上特徴のある領域の機能的役割を解明するため、RRF の示す基本的性質であるリボソーム結合能への影響を生化学的に評価することを試みた。まず RRF とリボソームの単独 2 者が結合することをショ糖密度勾配遠心法により証明した。更により簡便に、かつ系統的に 2 者間の結合を解析できる *in vitro* RRF-リボソーム 2 者結合系の構築を行い、各変異体 RRF タンパク質のリボソーム結合能を解析した。また、*in vitro* でポリソームをモノソームへと変換する古典的 RRF 活性測定系においても各変異体 RRF タンパク質の活性を解析した。これらの結果、RRF 分子のリボソーム結合ドメインを見出した。これにより、3.で見出した復帰変異が局在する立体構造上特徴のある 2 つの部位は tRNA と同様にそれぞれリボソーム 50S、30S サブユニットに架橋的に結合する部位であることが示された。

以上、本論文は遺伝学的、生化学的手法による解析と構造解析を融合させることにより、RRF において未知であったリボソーム結合性および、リボソーム結合ドメインを明らかにした。本研究は、RRF をモデル研究として、翻訳の普遍的メカニズムを解明する重要な鍵である翻訳因子群による「tRNA 分子擬態」という概念を、擬態構造と tRNA との相関性・相違性の双方を具体的に示すことで検証したものであり、タンパク質と tRNA の間の分子擬態という生物学の新しい概念に関して理解を深めるうえで重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。