

審査の結果の要旨

論文提出者氏名

清水 義宏

一般的に生体外蛋白質合成系は大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球などの細胞を破碎し、不要物を超遠心などで荒く除いた細胞抽出液が使用されている。当然のことながら、こうした抽出液には蛋白質を合成する上で必要な因子はすべて揃っているものの、蛋白質合成系にのみ特化したものではなく、プロテアーゼやヌクレアーゼなど蛋白質合成を阻害するものも含まれている。その結果、これを用いたシステムの蛋白質合成の効率は低く、特定の蛋白質を研究のために調製することは想像にも及ばないほどであった。しかし、1988年のSpirin, A. S.による連続法の開発により、収率の大幅な改善がなされ、さらにその後の細胞抽出液の調製法の改善、系の改良と反応条件の検討などにより、合成効率の改善が報告されている。しかしながら、これらの系は先ほど述べた阻害因子を完全に除去されたわけではなく、システムが細胞抽出液から構成されている限り、本質的な解決とはなっていない。

こうした観点から本論文では生体外蛋白質合成系を一から組み立てる、すなわち精製した、翻訳に必須な因子のみで再構成し、従来とは異なる蛋白質合成システム、PUREシステムの構築に成功している。前半部分では、PUREシステムの構築とそのシステムの利点について述べており、後半部分ではそのシステムの特性を生かして10Sa RNAというタンパク質合成系において機能するRNA分子の作用機序について様々な実験を行い、その作用機序の一端を明らかにすることに成功している。

序章ではポストゲノム時代におけるタンパク質研究における生体外タンパク質合成系の意義について説明を行っている。

第一章では必須因子のみからなる生体外タンパク質合成系、PUREシステムの構築とその利点を生かした応用面について述べている。大腸菌のタンパク質合成系において必須な酵素や因子をヒスタグとの融合タンパク質として大腸菌内で発現させ、一段階の精製操作によりほぼ単一に精製することに成功しており、またこれらが活性を十分に保持していることを様々な実験によって確認を行っている。また、これらの可溶性蛋白質因子群と、ショ糖密度勾配遠心を用いて高純度に調製したリボソーム画分、tRNA画分、T7ファージ由来のRNAポリメラーゼを用い、DNA依存的にDHFR(ジヒドロ葉酸還元酵素)など多種の蛋白質合成を行い、それぞれ目的の分子量をもった蛋白質の合成に成功している。さらに、その合成産物の活性測定も行い、それらが各自の活性を保持していることを確認しPUREシステムが生理活性のある蛋白質を合成する能力を有することを示しており、ここで精製した因子によるシステムの構築が、蛋白質を合成する上で必要かつ十分であることを明らかにしている。またその合成収量についても測定を行い、約1時間の反応で反応液1mlあたり約100マイクログラム以上のタンパク質合成を確

認し、このシステムが単位時間における合成効率についても従来の細胞抽出液のものと比較して、遜色のない性能のシステムであることを示している。また、PURE システムの内容物がヒスタグ融合タンパク質として存在していることを利用した簡便な精製方法を開発しており、さらには系から特定の終結因子を除去することによる高効率な非天然アミノ酸の導入方法の確立に成功している。

第二章では第一章で構築した PURE システムの、構成成分を自由に操作可能であるという特性を生かして 10Sa RNA の作用機序の解析を行っている。まず PURE システムで利用した因子群を用いて trans-translation 反応の再構築を試み、タンパク質因子 SmpB が trans-translation に直接的に働きかけている事を明らかにしている。また trans-translation においては SmpB 以外の因子が不要であることをも合わせて明らかにしている。さらに SmpB が trans-translation 反応において、10Sa RNA のアミノアシル化の促進及びアミノアシル化された 10Sa RNA のリボソーム A サイトへのエンタリーに必要不可欠であることを明らかにしている。また trans-translation 反応に EF-Tu が関与しないことを明らかにし、さらに 10Sa RNA の変異体を用いた実験の結果から 10Sa RNA がどのような形でリボソームにエンタリーしているかについて考察を行っている。

以上、本論文は PURE システムという従来にはないタイプの新しい生体外タンパク質合成系を構築し、さらにそのシステムの特性を生かした細胞内の RNA 分子の作用機序を明らかにしている。この成果は化学生命工学、特にバイオテクノロジー分野及び分子生物学分野の進展に寄与するところ大である。

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。