

論文審査の結果の要旨

氏名 佐藤 華江

本論文は、翻訳終結機構で終止コドンのアダプター因子として知られるペプチド鎖解離因子 (RF) のリボソーム作用部位と予測されるリボソーム蛋白質 L11 の分子機構解明を目指し、大腸菌をモデル生物として遺伝学的、生化学的手法による解析結果と L11 機能予測が述べられている。

第一章は、序論であり、翻訳反応の一般概論から、RF 解析の歴史、tRNA との機能的な類似性、RF ドメイン機能や立体構造解析など、RF の解説が記載されている。次に、RF 自身のドメイン解析から翻訳の場であるリボソームの解析へと研究対象を広げる目的として注目された L11 の一般概論と RF との関連を示す既存の報告、さらにその問題点について述べられた後、本研究の目的が記述されている。

第二章では RF の機能に作用するリボソーム解析を開始する目的として、() 大腸菌 RF 高温感受性変異株の高温生育能及び、*lacZ* ナンセンス変異でのリードスルー効率を指標としたプラスミドライブラリーによる遺伝学的検索、() オペロン構成を維持したプラスミド L11 発現系を利用したスクリーニングにより、翻訳終結活性を促進、または低下させる 21 種類の L11 変異体分離に成功し、リードスルー効率測定から、全ての L11 変異は RF1 と RF2 に等しく作用している事が述べられている。また、オペロンフィードバック制御機構を利用したプラスミド L11 変異体発現系の解説と、その有効性の検証が記載されている。このオペロンフィードバック制御機構を利用した L11 変異体発現法は、単純な過剰発現によって野生型との置換を期待したプラスミド過剰発現系とは異なり、転写強度差を利用して変異体 L11 オペロン mRNA 濃度を上昇させ、翻訳フィードバック制御機構の介在で、ゲノム由来野生型 L11 の発現を効率的に抑える新しい発現系である。

第三章では、第二章で分離された 21 の L11 変異体の中で代表的な 9 つの L11 変異体について、より詳細に解析された結果が述べられている。また、第二章で明らかにされた L11 の RF1 と RF2 の翻訳終結効率への等しい作用は、L11 が RF1 の翻訳終結効率を促進させるが RF2 の翻訳終結効率は低下させる、という過去に報告された L11 のコドン特異的作用と矛盾していたことから、その検証実験を行い、過去の報告との矛盾を解決している。主な解析の詳細は以下の通りである。

GTP 結合性蛋白質 RF3 との協調性検証：L11 は GTP 結合性翻訳因子の機能部位である GTPase Center の構成因子である事から、L11 変異体の示す翻訳終結機構への作

用には、GTP 結合性蛋白質 RF3 の関与が予測された。しかしながら、RF3 ノックアウト株におけるリードスルー効率測定から、L11 変異体の翻訳終結効率への影響は RF3 を介さずに RF1、RF2 に対して発揮される直接的作用である事が明らかとなった。

L11 変異体の作用機構解析:分離された変異体が実際にリボソーム上で機能している事を、タグ付き L11 変異体蛋白質を発現させた株からの精製リボソームにより確認した結果、ほとんどの L11 変異体がりボソームに取り込まれて機能する事を確認した。

L11 機能の *in vitro* 解析系の再構築: 既存の *in vitro* ペプチド解離活性測定法での問題点を改良し、近年開発された *in vitro* 評価系で、*in vivo* の結果を実証した。

第四章では、リボソームに取り込まれないにも関わらず、RF の翻訳終結効率を低下させる変異体の解析結果を述べている。これらの変異体の一つが、本来発現バランスを維持するために備える L11-L1 オペロンカップリングという現象に支障を来す既知の変異と一致したことから、L11 の発現系に影響する変異である事が予測された。そこで、これらの変異体形質転換体での精製リボソームにおける L11 定量を実施したところ、これらの変異体は細胞内の L11 欠損リボソーム濃度を増加させることで翻訳終結効率を低下させた事を明らかにした。

第五章では、上記解析結果から、L11 が A サイトの終止コドンを解読する前のコドン非特異的な結合を促進させるという機能予測が述べられている。さらに、L11 変異体の立体構造へのマッピングから、L11 は電荷を介した直接的作用により RF を感知し、rRNA-L11 間の相互作用により RF の再配置を誘導する事で RF のリボソームへの侵入を促進する、いわば『ドアノブ』のような機能を維持していると提唱している。

以上、本論文は原核生物 RF のリボソーム機能ドメインとして L11 に注目し、RF の翻訳終結効率に作用する L11 の機能部位を特定した。この解析を通して、既存の報告とは異なる L11 の RF コドン非特異的促進機能を解明に成功した事は RF のリボソーム作用機構の理解に貢献したと考えられ、博士(理学)の学位を授与できると認める。