

# 論文審査の結果の要旨

氏名 平林 直己

リボソームはタンパク質と RNA から構成された複合体であり、mRNA を鋳型としアミノ酸を重合するタンパク質合成装置である。近年、X 線結晶構造解析や様々な生化学的な解析によりその触媒反応はリボソーム中の RNA 成分 (rRNA) が中心的な役割を担うことが明らかとなってきた。rRNA は機能部位の二次構造や塩基配列が種を越えて高度に保存されている。本論文は rRNA の機能配列に着目し、rRNA が担うタンパク合成反応の機構の解明を目的として行われたものである。本論文は 2 章から構成され、リボソーム大サブユニットの rRNA 中に存在する進化的に高度に保存された領域、ヘリックス 69(H69)について研究が行われている。H69 のループ配列 (1912 位~1918 位) は原核生物の rRNA において 98%以上の保存性を保っている。そして H69 はサブユニット間の架橋部位の一つであることが判明している。また一連の翻訳反応において、A/T-site、A-site、P-site における tRNA と直接相互作用することが知られ、H69 は翻訳反応の様々な局面においてリボソーム機能に重要な役割を担うことが示唆されている。

第 1 章では H69 の保存配列の機能的な重要性に着目し、ある特定の遺伝子領域における機能配列を完全にランダムな配列より選択することを可能とする、新規に開発された機能配列選択法[Systematic Selection of Functional Sequence by Enforced Replacement(SSER)法]を用い、H69 の機能配列と必須残基を特定している。また得られた H69 変異リボソームの機能解析により翻訳反応における H69 の役割について検討している。

本章では PCR を応用した方法で H69 ループ領域を完全にランダムな配列(16,384 通り)に変換したプラスミドライブラリーの中からリボソームとしての機能を持った変異体を得て、リボソーム機能に必要な不可欠な塩基を決定した。その結果 1912 位と 1917 位は必要不可欠な塩基で、保存性が高いにも関わらず他の塩基に置換可能である部位と置換不可能である部位が存在することを明らかにした。また各変異体の生育速度を測定することで生育障害を示す変異体を得ている。

H69 はサブユニット間の架橋部位のひとつであることから、生育障害を示した変異体のサブユニットの会合状態をショ糖密度勾配遠心法により検討した結果、70S リボソームの割合は変異体では野生株と比べると明らかに低下していたことから、H69 はリボソームのサブユニットの会合に大きく影響することを明らかにした。

次に H69 は tRNA と直接相互作用していることから、H69 変異体の翻訳精度への影響をタンパク質の誤翻訳の割合を測定し、生育障害を示した変異体で翻訳精度が低下していることを明らかにした。このことから H69 はコドン認識における tRNA との相互作用に関与することが強く示唆された。

次に生育障害を示し翻訳精度にも影響を示した変異体からリボソームを回収し in vitro でのペプチド合成による翻訳活性を測定した結果、生育障害を示した変異体リボソームはペプチド合成能が低下し、またその機能はアミノアシル tRNA の濃度依存的であることを明らかにした。さらに A-,P-site binding により変異リボソームと tRNA との結合を測定し、H69 は A-site における tRNA との相互作用に関与することを明らかにした。またリボソームの会合や tRNA との相互作用に影響を示した変異体は共通して 1915 位に A の変異を持つことから、これらの影響はこの変異に起因するものと推測している。

第2章では H69 変異体の修飾塩基についてその有無を検証している。H69 の 1911 位、1915 位、1917 位は修飾酵素 RluD により修飾を受けるが、この欠損株では生育阻害が確認されている。H69 変異体はその塩基配列が野生株とは異なるために修飾酵素の認識機構に影響を及ぼし、前章の結果は必要不可欠な 1917 位の修飾欠損により導かれたものとも考えうるため、この 1917 位の修飾の有無をプライマー伸長法により検証した。その結果すべての変異体において 1917 位の修飾が確認され、前章の結果は H69 そのものの機能を検証したものと結論付けている。

以上要するに、本論文は 23S rRNA 中の高度に保存された H69 の機能解析を行うにあたり、新規に開発された SSER 法を用いて H69 の機能配列を決定した。さらに変異体の解析から、H69 はサブユニット間の結合に重要な役割を担うこと、コドン認識過程において tRNA との結合を調節することで翻訳精度に関わる重要な機能部位であることを明らかにした。この成果はタンパク合成反応の分子機構を解明する上で大変意義のある研究成果である。よって本論文は博士（生命科学）の学位請求論文として合格であると判断する。