

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 末松 卓真

本研究は、線虫ミトコンドリアにおけるポリペプチド鎖伸長反応を解明するため、大腸菌発現系を用いた線虫 *Caenorhabditis. elegans* ミトコンドリア EF-G1 及び EF-G2 の精製とその解析、そして、高純度な *C. elegans* ミトコンドリアリボソームを精製するため、組換えタンパク質を利用したアフィニティー精製による *C. elegans* ミトコンドリアリボソーム精製法の確立及び、*C. elegans* ミトコンドリア精製法の改善を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. pET52b(+)ベクターを基に作製した EF-G1 の発現ベクターによる、BL21(DE3)codon-plus (RIL)株の形質転換体を用いることで、*C. elegans* ミトコンドリア EF-G1 組換え体の大量発現系の構築に初めて成功した。この組換えタンパク質は、大腸菌リボソーム上での translocation 活性を保持していた。更に、*C. elegans* ミトコンドリア EF-G1 は、哺乳類ミトコンドリア EF-G1 と同様、フシジン酸に対する抵抗性を持つことが示された。
2. pCold-TF ベクターを基に作製した EF-G2 の発現ベクターによる、BL21(DE3)codon-plus (RIL)株の形質転換体を用いることで、大腸菌の trigger factor と融合した状態で可溶性タンパク質として発現させることに成功した。
3. *C. elegans* における、ミトコンドリアリボソームタンパク質である MRP4 のホモログタンパク質に S-tag 及び His-tag の並列タグを付加した組換えタンパク質を、*C. elegans* ミトコンドリア内で発現させることに成功した。更に、この組換えタンパク質が粗ミトコンドリアリボソーム画分に含まれていたことから、この MRP4 相同遺伝子産物は、*C. elegans* においてもミトコンドリアリボソームタンパク質として機能していることが示唆された。
4. ショ糖密度勾配遠心法を用いて精製したミトコンドリアリボソームの純度を改善するため、特に細胞質リボソームの混入を抑えるため、Percoll 密度勾配遠心を用いた、より高純度なミトコンドリア精製法の検討を行った。その結果、Percoll 濃度が 10%、20%と 40%という組み合わせの不連続な密度勾配でミトコンドリアを分画する方法を用いた場合、細胞質リボソームの混入がより少ないミトコンドリア画分を得ることに成功した。

以上、本論文は、線虫ミトコンドリアタンパク質合成系の主要な因子である、EF-G の生化学的解析を可能にし、また、より高純度なリボソームを得るための精製法を進展させた。本研究の成果は、線虫ミトコンドリア翻訳因子を用いた試験管内タンパク質合成系の再構築に、ひいては線虫ミトコンドリアタンパク質合成系の解明に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。