

審査の結果の要旨

氏名 横山 武司

本論文では、生物の翻訳機構で重要な役割を果たすリボソームをターゲットとして、その構造と機能との関係性を人工的に挿入変異を導入するアプローチで解き明かし、さらに得られた知見を元にリボソームを細胞内で人工的に制御する研究を行った。前半では、リボソーム上のどの領域にヘリックス構造を導入する事が出来るか、リボソームのどの領域が挿入変異に耐えうる潜在能力を持っているのかを解き明かす為に、Tn5 トランスポゾンを用いた、系統的挿入変異を導入するシステムを確立し、遺伝学的手法を駆使してリボソーム RNA (rRNA)上の挿入変異導入可能な領域を網羅的に明らかにした。さらに、論文提出者は、この結果得られたすべての変異株の増殖速度、また 16S rRNA 上に挿入変異を持つ物に対しては翻訳精度を測定し、挿入変異を有するリボソームの活性を評価した。その結果、挿入変異リボソーム i4,i5 では、顕著な増殖速度の低下と+1 フレームシフト頻度の上昇が確認された。真核生物リボソーム上には Expansion segments (ES)と呼ばれる挿入断片の存在が知られている。これは、原核生物の rRNA と真核生物のものを比較して、特定の領域で RNA の伸長が観察されたものである。これまで、ES の持つ機能について幾つかの事例が報告されており、真核生物特有のシステムに寄与する事が示唆されている。論文提出者が明らかにした、大腸菌 rRNA 上の挿入変異導入可能部位は、この ES の存在が知られている領域と、非常に良い一致を示した。この事は、原核生物リボソーム上には、本来挿入変異に対して寛容な領域があり、進化の過程でそれらの領域に挿入変異が繰り返され ES が獲得されていった事を示唆する結果である。また、これまでに ES の存在が知られていない領域にも、挿入変異を導入する事が可能である事が明らかになり、これらの領域で、現在までに解析されていない真核生物の rRNA 上で新たに ES の存在が確認されるかもしれない。

前半での結果を元に、後半では、系統的挿入変異の実験で明らかにされた場所に、新たな機能ドメインを付加し、人工的にリボソームを高機能化する事を目指した。論文提出者は、前半で挿入変異導入可能である事が明らかにされた、16S rRNA のヘリックス 26 の先端にテオフィリンのアプタマーを導入し、細胞内で、テオフィリンの結合依存的に活性を制御出来る、アロステリックリボソームの開発を目指した。このテオフィリン添加依存的なリボソームの活性上昇は、16S rRNA 上の Anti-SD 配列とレポーターとして用いたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(CAT 遺伝子)上の SD 配列を内在の翻訳系から、直交化させた系を用いてモニターした。レポーター遺伝子の翻訳量を測定は、CAT アッセイと大腸菌のクロラムフェニコールに対する阻止円の大きさを観察する事で行った。テオフィリン存在下で培養したアロステリックリボソームを有する大腸菌を用いて解析した所、テオフィリン非添加時と比較して CAT 遺伝子の翻訳量の上昇を確認した。論文提出者は、この時点で、テオフィリン添加依存な活性を有

するアロステリックリボソームの開発に成功した。続いて、テオフィリン結合によるアプタマードメインの構造変化を、**In-line** プロービング法を用いて生化学的に解析した。その結果、テオフィリン結合によるアプタマードメインの構造変化を明らかにし、テオフィリンアプタマー相互作用の存在を裏付けた。さらに詳細な制御機構の解明を目指し、アプタマー導入部位の構造生物学的な考察から、翻訳の開始過程に焦点を絞り研究を進めた。シヨ糖密度勾配遠心分離法を用いて、大腸菌内のリボソームを 30S, 70S, ポリソーム画分に分離し、テオフィリン添加、非添加で培養した大腸菌間でフラクション内の CAT mRNA 量を比較した。70S 以降の画分でテオフィリン依存的な、CAT mRNA 量の上昇が観察された為、この翻訳制御は 70S 開始複合体形成を制御している事が示唆された。また、翻訳のこの段階で SD, Anti-SD による SD ヘリックスが、リボソーム上を動く事が知られており、アプタマーを導入したヘリックス 26 は近傍に位置している。そこで、SD, Anti-SD の配列をこれまで用いてきた、Clone46 配列から CloneA1 配列に入れ換えた所、テオフィリン依存的な翻訳制御が観察されなくなった。以上の結果から、アロステリックリボソームによる人工翻訳制御は、テオフィリン-アプタマー間の相互作用による構造変化が、翻訳開始過程での SD ヘリックスの動きを空間的に制御する事で、70S 開始複合体形成を調節しているものと結論付けた。本論文で明らかにされた、リボソーム上の挿入変異導入可能な領域や、その結果を元に開発された、細胞内でリガンド結合依存的な活性を持つリボソームは、リボソームを利用した人工遺伝子回路の開発などに貢献する事が期待される。なお、以上の研究成果は、論文提出者が主体となって行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。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。