

論文審査の結果の要旨

氏名 齊 浩

本論文は3章からなり、第1章は無細胞蛋白質翻訳合成系（PUREシステム）を用い、原核生物*E. coli*の蛋白質翻訳中に異常停止したリボソーム複合体の調製、第2章は*E. coli*の翻訳異常停止したリボソーム複合体をレスキューするtrans-translationにおけるリボソーム蛋白質S1の機能解析、第3章はtrans-translationを非依存する翻訳異常停止をレスキューする過程の解析について述べられている。

大腸菌の生育は不完全mRNA翻訳の異常停止によるリボソーム複合体の形成に阻害されている。翻訳異常停止をレスキューする反応過程は大腸菌が環境に対応し、生育していく上で重要である。本論文の第1章は無細胞蛋白質合成系（PUREシステム）を用い、*E. coli*の蛋白質翻訳異常停止したリボソーム複合体の調製について述べられている。本論文の実験で基盤技術として使用された無細胞蛋白質合成系（PUREシステム）は原核生物*E. coli*の蛋白質翻訳過程に関わる必須のすべての因子を精製し、試験管で完全再構築された無細胞蛋白質翻訳システムである。このシステムは必須な最小因子群からなるため、反応メカニズム解析実験において、未知因子関与を最大限に排除することが出来る。論文提出者は終止コドンを持たない不完全のnonstop mRNAを用い、PUREシステムで、nonstop mRNAの翻訳系を構築し、無細胞蛋白質合成系で翻訳の異常停止を再現し、リボソームの複合体を調製した。その結果、安定する翻訳異常停止リボソーム複合体が結成することを示した。

*E. coli*では、翻訳異常停止のレスキュー過程としてtrans-translation反応が知られている。論文提出者はこのtrans-translation反応においてリボソーム蛋白質S1の機能に関して、*in vivo*と*in vitro*の実験報告に矛盾があることに注目した。本論文の第2章は論文提出者がPUREシステムで確立したnonstop mRNAの異常翻訳停止システムを使い、trans-translationにおいてリボソーム蛋白質S1の機能解析を行った。*E. coli*にはリボソーム蛋白質S1が必須であり、*in vivo*ではリボソーム蛋白質S1の関与を明らかにできない。論文提出者は精製した*E. coli*のリボソームから蛋白質S1を除き、S1除去したリボソームを調製し、PUREシステムでS1フリーの翻訳システムを構築した。論文提出者はこの蛋白質S1フリー翻訳システムを用い、S1フリー条件でtrans-translation反応を行い、*E. coli*蛋白質S1が翻訳異常停止レスキュー反応に必須因子でないことを初めて証明した。さらに精製した蛋白質S1の添加で、trans-translationのnonstop mRNAの翻訳異常停止複合体をレスキューする反応速度を測定したところ、顕著な影響が見い出せなかった。その結果、論文提出者は初めてリボソーム蛋白質S1フリーな翻訳システムを構築し、蛋白質S1が翻訳中に異常停止したリボソーム上でtrans-translation反応に関与しないことを証明した。

*E. coli*ではtrans-translationを非依存し、翻訳異常停止をレスキューする反応過程が幾つの*in vivo*での研究によって提唱されている。本論文の第3章は*E. coli*に、trans-translationを非依存する翻訳異常停止のレスキュー反応過程の解析を行った。論文提出者はラージペプチドを有する翻訳異常停止リ

ボソーム複合体のレスキューを注目し、簡易かつ迅速に翻訳異常停止リボソーム複合体の解析システムを構築した。最小限無細胞蛋白質合成システムを用い、nonstop mRNAの翻訳による翻訳異常停止のリボソーム複合体から長鎖のポリペプチドが自発的に解離できないことを証明し、さらに、*E. coli*の必須遺伝子Pth (peptidyl-tRNA hydrolase) がこの安定な翻訳異常停止複合体を基質に 長鎖のポリペプチドの解離を促進することを見いだした。または、Pthのこの新しい活性はより低いマグネシウムイオン濃度やRRF (ribosome recycling factor)の添加などの条件で促進された。その結果、論文提出者は長鎖のポリペプチドを有する翻訳異常停止複合体がRRFなど翻訳因子によって構造変化した後、Pthによってリボソーム上でpeptidyl-tRNAの加水分解、解離が促進されるモデルを提示した。

なお、本論文は上田 卓也氏、清水 義宏氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。