

論文審査の結果の要旨

氏名 周 站平

本論文は大腸菌における新生ペプチド品質管理の一端を担う trans-translation 機構に関する研究の成果をまとめたものである。この機構には、tmRNA という特殊な RNA (1 分子で tRNA と mRNA の両方の性質を持つ) と、SmpB 蛋白質の RNA-蛋白質複合体 (RNP) が関与する。そして、途中で切断された mRNA の翻訳等によって生じた“翻訳途中で異常停止したリボソーム-mRNA-新生ペプチド複合体”を解離させつつ、できそこないの新生ペプチドに分解用シグナルペプチドを付加する事で、新生ペプチドの品質管理に関わる仕組みであり、その解明は、ヒトを含めた他の生物種でも報告されている同様の品質管理機構の解明にも役立つと期待される。

第一章では、研究の背景が述べられている。trans-translation の特徴の一つは、tmRNA-SmpB 複合体が異常停止リボソームに結合する際にリボソーム A サイトの mRNA のコドン依存性がない事である。tmRNA の TLD (tRNA like domain) 部分はアラニン tRNA に構造が似ているものの、コドン認識部位 (アンチコドン アーム) を欠いている。一方、tmRNA-SmpB 複合体の A サイトへの結合によって trans-translation の各反応が開始される事から、tmRNA-SmpB 複合体の結合は何らかの方法でリボソームの小サブユニットにも認識されるはずである。従来構造解析の結果、SmpB が tRNA のアンチコドン アーム構造を擬態しており、また、生化学的解析の結果、SmpB の C 末端が認識に寄与している事がわかってきている。しかし、複数ある認識段階に対して、SmpB の C 末端のどの部位がどの段階に寄与しているのかは未解明であった。また、従来は複数ある反応段階を詳細に調べる手法がなく、その理解が限られていた。本章では、このような背景と結果の概要が述べられている。

第二章では、実験手法が述べられている。

第三章から第六章にかけては、tmRNA-SmpB 複合体の異常停止リボソームへの結合に際して、SmpB の C 末端がどのように寄与しているのかが述べられている。SmpB は 160 アミノ酸からなる蛋白質で、その C 末端 (30 アミノ酸) は特定の構造はとっておらず、天然変性状態にあると報告されている。この C 末端の寄与を明らかにするために、一連の欠失変異体 (SmpB130-SmpB153)、及び、機能に重要であると報告されている D137, K138, R139 の 1 つまたは 2 つをアラニンに置換した変異体が解析された。その結果、C 末端の特定の部分ではなく広範な部分が、結合認識に寄与している事が示された。

第七章では、反応段階を詳細に調べられる蛍光一分子観察法を用いて、ガラス上に固定化したリボソームと蛍光標識 tmRNA-SmpB 複合体間の相互作用解析が述べられている。まず、リボソームを安定的かつ簡単に標識する新規手法を開発した。具体的には、リボソームの小サブユニットの S2 蛋白質に HaloTag 蛋白質 (297 アミノ酸) を融合させた変異リボソームを用い、HaloTag 蛋白質に特異的に共有結合する HaloTag リガンドを介して蛍光標識、及び、

固定用の biotin 標識を行った。この標識リボソーム (Cy3-biotin リボソーム) は蛋白質翻訳能を有しており (野生型の 70%)、また、SsrA タグ化反応も起こる事から、活性に問題がないことが示された。一方、tmRNA も複数の標識法を比較検討し、活性に影響がない蛍光標識法を見出した。更に、観察ガラスの表面処理方法にも独自の工夫を加え、非特異結合を防いだ。その結果、1 分子のリボソームに 1 分子の tmRNA-SmpB 複合体が相互作用する様子をリアルタイムに観察するのに成功した。この実験系を用いて、まずは単純な反応を解析した。mRNA も新生ペプチドも保持していない“空のリボソーム”に tmRNA-SmpB 複合体が相互作用する様子を観察し、個々の相互作用を解析・統計処理した結果、tmRNA-SmpB 複合体がリボソームに結合してから解離するまでには少なくとも 2 つの経路がある事がわかった。これは、tmRNA の TLD 部分のみからなる変異体を用いても観察されたことから、tmRNA の特徴的な構造部分 (mRNA Like domain (MLD) や 4 つの pseudoknots) が原因ではなく、TLD 部分の認識に起因する事が示唆された。このように本研究で立ち上げた実験系は、trans-translation 機構の詳細な解明に寄与すると期待される。また、本研究で開発されたリボソームの新規標識方法は、細胞内での観察も含めて広く応用が可能であり、評価に値する。

よって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。