

審査の結果の要旨

氏名 楊 倬皓

近年、翻訳途上のポリペプチド鎖がリボソームトンネルと相互作用して翻訳を停止させ遺伝子発現の制御を行う例が複数報告されている。この現象は「翻訳アレスト」と呼ばれ、その代表例が、大腸菌の分泌タンパク質 SecM である。SecM は C 末端付近に、アレスト配列と呼ばれる翻訳アレストを誘起する特殊な配列を持つ。アレスト配列が翻訳され、リボソームトンネルと相互作用すると、リボソームの P サイトのペプチジル-tRNA から A サイトのプロリル-tRNA へのペプチジル転移反応が阻害され、翻訳が停止する。その結果、mRNA の構造変化が誘起され、同一オペロンの下流遺伝子 *secA* の発現が誘導される。アレスト配列が翻訳アレストのための必要十分条件であると考えられていたが、本研究では翻訳された SecM のリボソーム外領域が、翻訳アレストの安定性に寄与するか検討している。また、SecM の翻訳アレストは、翻訳途上の SecM の N 末端側が Sec 膜透過装置により物理的に引っ張られることで解除されると考えられているが、張力を加えることで翻訳が再開されることは未だに証明されていない。本研究は、光ピンセットや磁気ピンセットを用いて 1 分子の SecM を引っ張り、負荷により翻訳アレストが解除されるまでの時間がどのように変化するかを定量し、翻訳アレストの分子機構を明らかにすることを目指している。

本論文は、4 章より構成されている。第 1 章「序論」では、本研究の目的と背景、および概要が記載されている。

第 2 章では「新生 SecM のリボソーム外領域が翻訳アレストの安定性に及ぼす影響」について述べられている。楊は、SecM 翻訳アレストの安定性を評価するために、翻訳アレスト複合体の寿命を測定した。HaloTag タンパク質の下流にリンカーを介してアレスト配列を付与したコンストラクト (図 1 A) を *in vitro* で翻訳し、中性条件下で SDS-PAGE を行うことにより、翻訳アレスト複合体を検出した。中性条件下ではペプチジル-tRNA が保持されるため、翻訳アレストが引き起こされれば、tRNA (15 kDa 程度) が付加されたポリペプチド鎖が検出される。ポリペプチジル-tRNA に由来するバンドの残存率の時間変化から、翻訳アレスト寿命を算出した。その結果、翻訳アレスト時のリボソーム外領域を変えることでアレスト寿命が大きく変化することを見出した。HaloTag とアレスト配列間に異なる長さの GS リンカー (8 aa、17 aa、26 aa) を入れたところ、8 aa のリンカーではほとんど翻訳アレストが検出できず、リンカーが長くなるにつれて寿命が 5, 7, 11 min と伸びていった。また、GS リンカーより長い、硬い構造をとる protein D (92 aa) を入れたところ寿命は 9.4 min だった。一方、全長の SecM を用いた場合は、アレスト寿命が 51 min となり最も安定だった (図 2 B, C)。以上の結果から、リボソーム外の新生ポリペプチド鎖のフォールディングによる力が翻訳アレストを解除しうること、SecM のリボソーム外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることが示された。

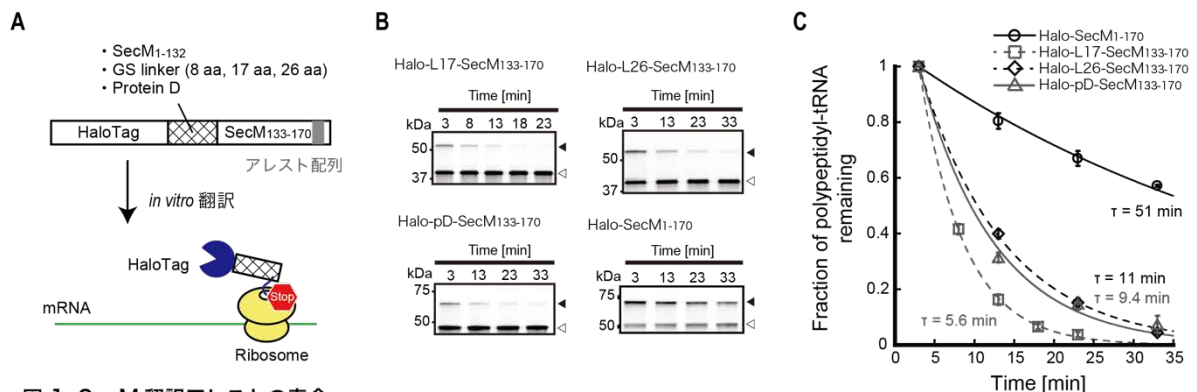


図 1 SecM 翻訳アレストの寿命

(A) 実験に用いたコンストラクト (B) 中性 SDS-PAGE による一定時間おきのタンパク質-tRNA (黒三角で示す) の検出

(C) 翻訳アレスト複合体の残存率の時間変化および 1 次の指数関数によるフィッティング

第3章では「物理的な負荷による SecM 翻訳アレストの解除」について述べられている。楊は、SecM に人工的に負荷を加えて翻訳アレストを解除し、下流の翻訳が再開される様子を 1 分子観察することを目指した。そのために、新生ポリペプチド鎖を引っ張りながら、翻訳を観察できる実験系を開発した。HaloTag-SecM-LacZ の mRNA に Digoxigenin-DNA ハンドルを結合させ、Anti-digoxigenin ビーズの表面に固定した。*in vitro* 翻訳によりこのビーズ上の mRNA を翻訳させ、HaloTag-リボソーム-mRNA の翻訳アレスト複合体をビーズ上に提示した。HaloTag に Biotin リガンドを結合させ、Streptavidin ビーズに連結した。光ピンセットを用いて、2つのビーズを逆向きに引っ張ることで翻訳アレスト複合体の新生ポリペプチド鎖に負荷を加えた。その結果、リボソームが翻訳を再開し、SecM の下流に導入した LacZ を翻訳する様子を観察することに成功した。次に、翻訳アレスト解除の負荷依存性を調べるため、磁気ピンセットを用いて多数の翻訳アレスト複合体に同時に負荷を印加し、翻訳の再開を 1 分子計測できる実験系を開発した。アレスト複合体の HaloTag を Streptavidin を介してガラス基板上に固定し、mRNA には磁気ビーズを結合させた。磁石を用いて測定範囲内の全てのビーズに一齐に負荷を印加し (図 2 A)、磁気ビーズの回折パターンから 3 次元の位置を測定することで (図 2 B)、リボソームの翻訳を可視化した。全長の SecM の翻訳アレスト複合体に負荷を印加すると、翻訳アレストが解除され、下流遺伝子の翻訳が観察できた (図 2 C)。加える負荷を強くすると、翻訳アレスト寿命が短くなった。これにより、翻訳アレストが負荷依存的に解除されることが確かめられた。この実験系を用いて、SecM の翻訳アレストを人工的に解除し、任意の下流遺伝子の翻訳を観察することができるようになった。また、翻訳の終結反応や抗生物質の反応、局所的な翻訳速度の変化を観察することに成功した。

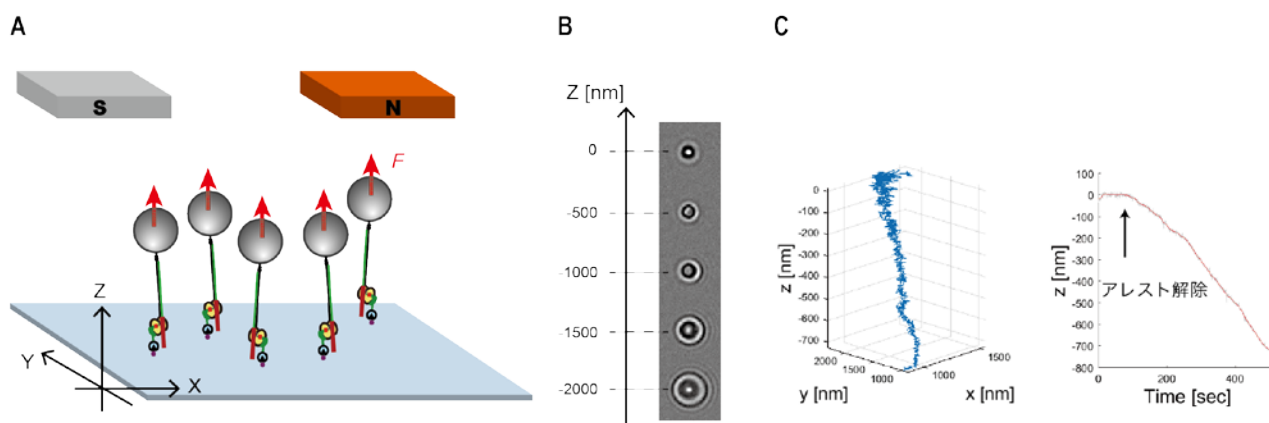


図 2 磁気ピンセットによる SecM 翻訳アレストの解除

(A) 磁気ピンセットを用いた翻訳アレスト解除の測定系 (B) 磁気ビーズの回折パターンによる 3 次元トラッキング

(C) 磁気ピンセットで測定されたビーズの 3 次元の動きおよび Z 方向の動きの時間変化

第4章「総括」では、本研究の意義がまとめられている。

以上のように、本研究では、様々なコンストラクトを作製して、SecM の翻訳アレスト寿命を測定することで、リボソーム外領域の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストの安定性を変えることを見出した。また、天然の SecM のリボソーム外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることを明らかにした。本研究の結果から、SecM の安定な翻訳アレストは、アレスト配列とリボソーム外領域との協調によって成り立っていることが示された。また、本研究では、光ピンセットおよび磁気ピンセットを用いた 1 分子力学測定系を構築し、新生ポリペプチド鎖を引っ張りながら、リボソームの翻訳を観察することに世界で初めて成功した。本研究の手法により、SecM を用いて翻訳の安定な停止と迅速な再開が可能となった。今後、SecM を利用した翻訳の研究へと応用されていくことが期待できる。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。