

## 論文審査の結果の要旨

氏名 田島研也

翻訳系では、リボソームやタンパク質因子が mRNA を翻訳し tRNA 上でペプチド新生鎖が伸長される。ペプチド新生鎖と tRNA からなるペプチジル-tRNA が誤ってリボソームから脱落することがあるが、そのメカニズムは未解明であった。脱落を誘起し得る現象として mRNA 上でのリボソームの停止(ストール)があり、一例としてペプチジルトランスファー速度の遅いプロリンの連続導入が挙げられる。田島氏は修士課程で *in vitro* 系を用いてプロリン 2 残基によってストールしたリボソームからペプチジル-tRNA が脱落し、mRNA の途中から翻訳が再開して C-末端側ペプチド断片が生じることを見出した。さらにプロリン上流のペプチド新生鎖配列がペプチジル-tRNA の脱落頻度を制御することを 4 種類の配列を用いて見出した。ペプチジル-tRNA 脱落の制御について多数のペプチド新生鎖配列を網羅的に評価し、*in vivo* 系で上記のペプチジル-tRNA 脱落・翻訳再開経路を検証することで、異常なタンパク質翻訳合成メカニズムの理解を推し進めると期待される。本博士論文では上記の二点を達成するという独自性の高い研究を行っている。

本博士論文は 4 章からなる。第 1 章は序論であり、原核生物の翻訳メカニズム、ペプチジル-tRNA 脱落の先行研究、リボソームのストールの先行研究について概説している。また、田島氏の修士課程での研究結果の要旨について述べられている。

第 2 章では、多数のペプチド新生鎖配列のペプチジル-tRNA 脱落制御を網羅的に評価する系の構築とその応用について報告している。これまでに RaPID システムと次世代 DNA シークエンサーを用いて、標的結合ペプチドの 1 アミノ酸残基を網羅的に非天然アミノ酸に置換した変異体の結合力を分析することで、各アミノ酸変異が標的結合力に及ぼす影響が網羅的に評価されてきた。田島氏はこの手法を応用してペプチジル-tRNA が脱落せず C 末端まで合成されたペプチドの配列情報を獲得する系を構築し、ペプチジル-tRNA 脱落制御についてプロリン 3 残基の上流 1-3 アミノ酸残基のペプチド新生鎖配列の網羅的分析に挑んでいる。可能なペプチド新生鎖配列 8420 種類を網羅的に分析した結果、EF-P を含まない系では 3 残基連続するプロリンの直前のアミノ酸によるペプチジル-tRNA 脱落制御が明らかになり、特に極性アミノ酸(アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、アルギニン)によってペプチジル-tRNA 脱落が誘起されることが明らかになった。また EF-G 濃度の上昇に伴って極性アミノ酸依存的なペプチジル-tRNA 脱落の頻度が上昇した。プロリンの連続導入を促進するタンパク質 EF-P を含む系では多数のペプチド新生鎖配列に対してペプチジル-tRNA の脱落が抑制された。これらの結果から、ペプチド新生鎖のアミノ酸側鎖の極性に応じたリボソームトンネルとの静電相互作用または静電反発が P サイトのペプチジル-tRNA を不安定化して脱落させることが推測される。

第 3 章では、*in vivo* 系を用いたペプチジル-tRNA 脱落と翻訳再開経路の検証について報

告している。大腸菌では 1000 種類以上のタンパク質や推定タンパク質がその N 末端から 50 残基以内にプロリン残基を連続して含み、短いペプチジル-tRNA を脱落させる可能性があった。染色体の *efp* 遺伝子を欠損させた大腸菌(*E. coli*  $\Delta$ *efp*)とこれに *efp* 遺伝子を相補した大腸菌(*E. coli*  $\Delta$ *efp*/+*efp*)で N 末端近傍にプロリンを連続して含むタンパク質を発現・精製し、N 末端のアミノ酸を欠損したタンパク質を検出することで、*in vivo* タンパク質合成系でのペプチジル-tRNA の脱落に伴う翻訳再開の実証に挑んでいる。5 種類のタンパク質を発現・分析した結果、YhhM タンパク質では全長タンパク質と共に 2 残基連続するプロリンの直後で切れた C 末端側のタンパク質断片が検出された。また *E. coli*  $\Delta$ *efp* で発現した場合と比較して、*E. coli*  $\Delta$ *efp*/+*efp* で YhhM を発現した場合全長タンパク質の発現が促進され、C 末端側タンパク質断片の生成が抑制された。これらの結果から、ペプチジル-tRNA 脱落に伴う翻訳再開が *in vivo* タンパク質合成系で生じる現象だと世界で初めて実証され、EF-P がペプチド新生鎖へのプロリンの連続導入を促進するとともにペプチジル-プロリン-tRNA の脱落を抑制する機能も併せ持つことが示唆された。

第 4 章は総括であり、本論分の成果と研究の方向性を結論付けている。これまでペプチド新生鎖配列依存的なリボソームのストールとペプチジル-tRNA の脱落は別個の現象として扱われてきた。田島氏は修士課程で両者の因果関係を明らかにし、本博士論文では *in vitro* 系でペプチジル-tRNA 脱落を制御するペプチド新生鎖配列を網羅的に解析し、*in vivo* 系で翻訳再開による C 末端側タンパク質断片の生成を実証したことで基礎研究で大きな成果を挙げた。非極性ペプチド新生鎖を用いることで、ペプチジル-tRNA 脱落を抑制しプロリン以外の導入効率が低い非タンパク質性アミノ酸を効率よくペプチド鎖へ導入できると期待される。またペプチジル-tRNA 脱落に伴う C 末端タンパク質生成を実証したことで、翻訳系で起きる異常なタンパク質合成メカニズムの新たな視座を築き、その全容の理解に貢献すると期待される。

以上のことより、本審査会委員は総意のもと、田島研也氏の学位請求論文は博士(理学)の学位授与に十分資すると認め、合格の判定を下した。