

審査の結果の要旨

氏名 阿部 大翔

本論文は、酵母由来再構成型生体外蛋白質合成系を利用した酵母 Eukaryotic Initiation Factor 5A (eIF5A) の機能解析について述べられている。

eIF5A は真核細胞で広く保存された必須なタンパク質で、連続プロリン配列の翻訳を促進する。最近では eIF5A 依存的に翻訳が促進される配列が連続プロリン配列以外にも見出されている。また eIF5A は翻訳終結におけるペプチド解離反応も促進する。eIF5A はリボソームの E-site に結合し、ペプチジル tRNA の CCA 末端を安定化することにより、リボソーム上の遅いペプチド転移反応を促進し、翻訳において広く伸長および終結過程ではたらく因子であると考えられている。eIF5A は細胞の生育に必須な翻訳後修飾ハイプシンを有する細胞で唯一のタンパク質としても知られる。連続プロリン配列の翻訳は eIF5A のハイプシン修飾依存的に促進されるが、現在のところハイプシンの作用機序の詳細はよく分かっていない。本研究では、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を構築し、連続プロリン配列における翻訳抑制機構の解明、および eIF5A の機能解明を目指した。

論文提出者はまず、酵母由来再構成型生体外蛋白質合成系の構築を行った。Cricket Paralysis Virus (CrPV) の Internal Ribosomal Entry Site (IRES) を介する翻訳を利用して、翻訳開始因子非依存のタンパク質合成系を構築した。CrPV IRES の下流に nanoLuciferase (nLuc) をコードした mRNA、酵母 80S リボソーム、予めチャージした酵母アミノアシル tRNA、翻訳伸長因子 (eEF1A、eEF2、eEF3)、および翻訳終結・リボソーム再生因子 (eRF1、eRF3、Dom34、Hbs1、Rli1) を用いて酵母タンパク質合成系を再構成し、活性のある nLuc の合成に成功した。

続いて翻訳反応におけるマグネシウムおよびポリアミン濃度の検討を行った。内部に連続プロリン配列を含むレポーター mRNA を利用し、合成された nLuc 活性によって翻訳停止を評価した。その結果、低 Mg^{2+} 濃度、低ポリアミン濃度の条件下でのみ、連続プロリン配列依存の翻訳抑制が起こることを見出した。以降、 $[Mg/SPD/SP] = [5/0.25/0]$ で解析を進めた。

次に、連続プロリン配列の翻訳における eIF5A およびハイプシン修飾の影響を調べた。hypusine 修飾 eIF5A (Hyp)、deoxyhypusine 修飾 eIF5A (Deoxy)、未修飾 eIF5A (Lys) を用いて、連続プロリン配列を有するレポーター mRNA の翻訳を行った。その結果、未修飾 eIF5A (Lys) を含む全ての種類の eIF5A によって翻訳促進効果がみられた。この結果は、連続プロリン配列における翻訳抑制を解除するのにハイプシン修飾は不要であることを示しており、これまでに報告のない新たな知見である。またハイプシン修飾は、特にタンパク質の N 末にある連続プロリン配列と、タンパク質の内部にある長い連続プロリン配列の翻訳に重要であることが明らかになっ

た。

更に、連続プロリン配列をもつリポーターmRNAの翻訳産物をトリシンPAGEによって解析した。その結果、連続プロリン配列で翻訳停止がおきてリボソーム上にポリプロリル tRNA が存在していること、さらにそのポリプロリル tRNA が PTH 感受性を示すことから、翻訳停止したリボソームはポリプロリル tRNA によって不安定化されてペプチド転移反応が阻害されていることが示唆された。

従来の eIF5A の機能解析には *in vitro* ペンタペプチド合成系を用いられてきた。本研究では確立した酵母再構成型蛋白質合成系を用いることにより、はじめて長いタンパク質の翻訳伸長過程における eIF5A およびハイプシンの役割を明らかにした。また、これまで連続プロリン配列依存的な翻訳抑制機構は、リボソーム上のプロリル tRNA の配向異常から説明されてきたが、新生ペプチド鎖中のポリプロリン配列とリボソームトンネルの相互作用を介した翻訳停止機構を見出した。

タンパク質合成における翻訳伸長制御は、タンパク質のフォールディングや局在制御など、様々な細胞機能の制御に関わっていることが明らかにされており、その分子機構の解明は重要な研究課題となっている。本研究は、eIF5A のハイプシン修飾の役割を明らかにするとともに、新生ペプチド鎖を介した翻訳伸長制御機構について新しい知見を与えるものである。また、論文提出者が確立した酵母再構成型蛋白質合成系は、真核細胞における翻訳伸長制御機構を理解するための基盤となる重要なものと言える。

よって本論文は博士（科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1983 字