

審査の結果の要旨

氏名 長井 陸

本論文は六章から構成されており、第一章では本研究における背景について述べられている。本章では、まず、生体内におけるタンパク質合成反応、つまり翻訳反応の概要と、翻訳における終結反応の概要が述べられている。次に、センスコドン上における中途翻訳終結について、先行研究における知見を紹介している。最後に、従来の翻訳終結反応の生化学的な手法の問題点、つまり、終結因子と競合する因子が限定された解析がなされていたこと、また新生ペプチド鎖の長さや配列にも制限があったことが述べられている。そこで、本解析では、これらの問題点を解決できる、当該者が所属する研究室で開発された、全長のタンパク質が合成可能な、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いて、翻訳終結反応を解析したことが述べられている。

第二章では、実験材料と試薬調製、および、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系によるタンパク質合成の方法が述べられている。実験材料と試薬調製の章では、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で用いた mRNA 及び翻訳因子の調製方法が述べられている。酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系によるタンパク質合成の章では、本系を用いた発光タンパク質 nanoLuciferase の合成方法及び、その検出方法が記載されている。さらに、本系を用いた短いオリゴペプチドの合成方法及び、その検出方法が記載されている。

第三章では、本解析の結果が述べられている。まず、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系に与える eEF1A の効果を解析している。本系において、nanoLuciferase を翻訳する場合、高濃度の eEF1A が翻訳量を増加させることを示している。さらに、これに関して、短いペプチドの合成系による結果と比較することにより、本系における eEF1A の機能について議論している。次に、この結果を踏まえ至適化された翻訳系を用いて、翻訳を抑制する連続 CGA コドン配列における翻訳を解析している。その結果、連続 CGA 配列における eRF1 依存的な終結を発見している。また、連続 CGA 配列における eIF5A の効果を検証している。さらに、eRF1 依存的に、翻訳が複数回繰り返される短いオリゴペプチド合成系において、連続 CGA 配列において eRF1 依存的な終結が起こることが支持されている。次に、終止コドンにおける、eRF1 非依存的な終結を nanoLuciferase の合成系において発見し、さらにそれを、短いペプチドの合成系における結果が支持している。また、eIF5A が、終止コドンにおける eRF1 非依存な終結に与える影響を、nanoLuciferase の合成系、および、短いペプチドの合成系において検証している。

第四章では、本解析の結果、および、先行研究の結果を踏まえた考察が述べられている。まず、本研究の総括が述べられている。本論文は酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を利用して、タンパク質合成における終結反応を解析したものである。本系は、終結因子 eRF1 によるペプチド解離反応と競合する因子やイベントの存在下で解析することができ、終結反応の制御の解明に有効であることが述べられている。本系を用いた解析によって、本系において、eEF1A 濃度が翻訳開始に影響を与えることが示唆された。さらに、この結果を踏まえて至適

化された翻訳系を用いることで、連続 CGA 配列における eRF1 依存的な終結と、終止コドンにおける eRF1 非依存的な終結を発見したことが述べられている。さらに、本系の構築についての総括が述べられている。この章では、最適化された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の有用な点及び、問題点が述べられている。次に、本解析における eIF5A の翻訳における効果が述べられている。次に、連続 CGA 配列における eRF1 依存的な終結と、終止コドンにおける eRF1 非依存的な終結の分子機構を議論している。さらに、センスコドン上における翻訳終結の生理的意義について議論している。

第五章では、本論文の執筆にあたって、参考にした文献が記載されている。

第六章では、本論文の執筆、および、本論文の研究の遂行にあたって、助言、指導を行った者への謝辞が述べられている。

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 1783 字