

審査の結果の要旨

氏名 大塚 衆志

本論文は、翻訳停滞を示すリボソーム機能構造についての研究の結果と考察を含む研究論文であり、五章から構成されている。第一章は本研究の背景を示す序論、第二章は実験材料と方法、第三章は研究結果、第四章は第三章の結果に対する考察、第五章は本研究の総括と展望が記述されている。また、第五章に続いて参考文献リストがまとめられている。審査結果の要旨は以下の通りである。

タンパク質の合成過程における翻訳停滞は、翻訳効率の悪いコドンの連続や RNA 高次構造などによってタンパク質合成途中のリボソームが mRNA 翻訳中に停止する現象である。翻訳停滞現象には、翻訳装置や mRNA 構造の異常などにより引き起され、正常タンパク質の産生につながらない排除すべき有害なもの、停滞と再開が制御されることで正常タンパク質産生のために翻訳後修飾や複合体形成と共役するものがある。不毛な翻訳停滞には、リボソームレスキューと呼ばれる再生反応機構を誘導する分子識別機構が想定されている。

発生している翻訳停滞が排除すべき「異常」であると識別されるための分子機構の先行研究により、重要因子として E3 ユビキチンリガーゼ Hel2、ユビキチン化のターゲットとなる S20 リボソームタンパク質、およびリボソーム親和性タンパク質の一つでもある Asc1 が報告されていた。また、クライオ電顕法による先行研究から、翻訳停滞状態のリボソームに後続のリボソームが衝突することで形成される衝突リボソームダイマー構造には、前後リボソームの衝突界面で前後それぞれのリボソームに結合した Asc1 の近接状態が観察され、この部位が Hel2 に認識されリボソームユビキチン化が促進されるというモデルも提唱されていた。しかしながら具体的な機能性の実証や、関連するリボソーム分子機能についての理解が取り残されていた。

学位申請者は、本学位研究で翻訳停滞時のリボソームレスキュー活性を検出・評価可能な出芽酵母アッセイ株を樹立し、未知のリボソーム機能領域を探索するために、無作為な変異を導入したリボソームタンパク質発現ライブラリーから、分子遺伝学的手法によりリボソームレスキュー活性をドミナントに阻害する変異体の分離を行い未知の分子機構の解明を試みた。その結果、Asc1 および S20 における詳細な機能構造領域を同定し、これまでに構造情報から予測されていたリボソーム衝突モデルの妥当性、およびリボソーム上で発生する具体的な相互作用の推定に成功し、また同時に、新規なリボソーム機能領域も見出すなど新規なモデルの提案につながる具体的な成果が得られたことについて取り纏めている。

最初に、出芽酵母において翻訳停滞シグナルとなる CGA コドンの連続配列を利用したリボソームレスキューアッセイ株を樹立した。この株にポジティブコントロールとしてプラスミド上から供給する S20 の翻訳停滞に関わるユビキチン化残基部位の変異体を導入したところ、リ

ボソームレスキュー活性の低下が観察され、アッセイ株により目的とするドミナントネガティブ変異体の分離が可能であることが示された。

続いて、Asc1 と S20 についてアッセイ株による網羅的な変異体分離を実施したところ、数多くの変異体が分離された。変異部位をリボソーム衝突構造上へとマッピングし吟味したところ、先行する停滞リボソームの Asc1 と後続衝突リボソームの S20 によって形成される界面の重要性が明らかになり、この部位が Hel2 のドッキング部位であるという仮説を立てた。このことを実証するために、細胞質での 2 因子間相互作用解析法である splitTRP1 法を用い、実際に Asc1 および S20 変異体が翻訳停滞時に Hel2 と Asc1 との相互作用を阻害することが示された。さらに、ショ糖溶液と超遠心を用いたリボソーム沈殿解析から、Asc1 および S20 変異体を発現させることで翻訳停滞時のリボソームに取り込まれる Hel2 量が減少することを確認することで、その結論を確かなものとした。この解析結果を踏まえ、Hel2 が翻訳停滞したリボソーム上で S20 をユビキチン化する新規なモデルの提案につながった。

さらに、これら既知の因子と構造上近接する 8 つのリボソームタンパク質について網羅的な変異体分離を試み、新たにリボソームタンパク質 S31 を関連因子として同定することに成功した。S31 変異体のリボソーム構造上へのマッピングからリボソームレスキュー反応で中心的な機能を持つとされる tRNA 擬態因子 Dom34 との機能相関が推察されたため、Dom34 の機能を *in vivo* で解析できる S6A 欠失時の低温感受性実験を行い、S31 の変異が、Dom34 をロックダウンすることと同様の表現型を示すことを明らかにした。以上のことは、リボソームレスキューに反応に、遺伝暗号解読部位との関連性があることを示唆している。

本研究は、構造から推測した翻訳停滞のレスキュー機構における具体的な機能残基領域を明らかにすることで、多様なリボソームレスキュー反応理解のための重要な手がかりを与えるものと判断された。なお、本論文は伊藤耕一、遠藤慧、和田美紀との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断された。

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 2 2 0 1 字