

審査の結果の要旨

氏名 青山 遼

本論文は6つの章から構成されている。第一章「序論」では本研究における背景について、リボソームの組み立ての理解と、リボソームの機能改変という二つの側面から述べられている。前者においては、リボソームの組み立てを理解する上での試験管内再構成という手法の有用性、リボソームの試験管内再構成によってこれまで得られた知見及び現行の手法の問題点を挙げている。後者においては、リボソームの変異導入及び合理的設計による機能改変リボソームの実例を挙げたのち、より効率的にリボソーム改変体を取得する方法として試験管内再構成を用いた方法を述べている。そしていずれの側面においても、50Sサブユニットの試験管内再構成の難しさが技術的なボトルネックとなっていることを指摘し、これを解消するための基盤技術として、個別調製した組み換えリボソームタンパク質を用いて試験管内再構成を行う手法を挙げ、その調製の難しさについて述べている。

第二章「実験手法」及び第三章「実験結果」における記述は、50Sサブユニットを構成する要素の調製に関するものと、それらを用いた50Sサブユニットの試験管内再構成及び性状・翻訳活性評価に関するものの2つに大別される。

50Sサブユニットを構成する要素の調製については、その大半が組み換えリボソームタンパク質33種類の高純度な個別調製法に関する。これは第一章で指摘していた、組み換えリボソームタンパク質の精製度に関する20年前からの課題を、精製法の改良によって解決するものである。また、各々のリボソームタンパク質の精製法は、バッファー条件やカラムの選択などの詳細な精製手順に至るまで最適化されている。その中には、可溶化タグを持つ目的タンパク質を不溶化したり、アフィニティタグを持つ目的タンパク質のアフィニティ精製において素通り画分を回収するような、常道を外れた独創的な手法も含まれる。

50Sサブユニットの再構成及び性状・翻訳活性評価においては、個別調製したリボソームタンパク質を用いた再構成50Sサブユニットの作製に成功したことが述べられている。性状評価においては、大腸菌内在性のリボソームタンパク質群を用いて再構成した場合と概ね同等のものを再構成したことが、再構成産物の構成要素とサイズの両面から示されている。翻訳活性評価においては、組み換えタンパク質を用いた再構成50Sサブユニットがタンパク質の全長を合成するだけの翻訳活性を有することが初めて示された。その活性は大腸菌内在性50Sサブユニットの10%程度であるが、組み換えタンパク質から翻訳活性のある50Sサブユニットを再構成するというコンセプトは達成されている。更に、30Sサブユニットの試験管内再構成と組み合わせることで、全てのリボソームタンパク質が組み換えタンパク質に置換された大腸菌70Sリボソームの作製を初めて達成している。以上より、本研究の手法及び結果について十分な先進性・新規性が認められる。

第四章「考察」においては本論文の総括および考察が行われている。第三章における結果を解釈し、第一章で述べたリボソームの試験管内再構成に関する課題を踏まえて、本研究に残された課題及びそれを解決するためのアイデアが提示されている。また本研究内容の発展の可能性に

ついて、リボソームの組み立てを理解するための理学的研究と、組み立てたリボソームを利用する合成生物学的研究の両面から述べられている。

第五章では参考文献が、第六章では謝辞が述べられている。

なお本論文において、質量分析は益田 恵子、30S サブユニットを構成する組み換えリボソームタンパク質の精製は田丸 大知、PURE system 内での 30S サブユニットの試験管内再構成系構築は下條 優の研究成果である。しかし本論文の主要な主張である、組み換えリボソームタンパク質による 50S サブユニットの試験管内再構成については論文提出者が主体となって分析及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できる。

よって本論文は博士（医科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1683 字