

学 位 審 査 報 告 書

（ふりがな） 氏 名	ごとう しもん 後藤 史門
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学 位 記 番 号	論 理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
（学位論文題目） RsgA はリボソーム生合成過程の後期に RbfA を 30S サブユニットから解離させる	
論 文 調 査 委 員	（主査） 森 和俊 教授 大野 睦人 教授 大森 治夫 准教授

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	後藤 史門
論文題目	RsgA はリボソーム生合成過程の後期に RbfA を 30S サブユニットから解離させる		
(論文内容の要旨)			
<p>リボソームは数十種類の蛋白質および RNA から成り、いくつもの活性部位を備えた巨大な複合体である。ここ十年ほどの間にリボソームの結晶構造が次々報告されて、その精緻な構造の詳細が急速に明らかになっている。その一方で、この複雑な複合体が生体内でいかに組み上がるのか、その過程に関する理解は、専ら成熟したリボソーム RNA とリボソーム蛋白質を用いた <i>in vitro</i> での再構成の観察に頼ったものにとどまっている。近年、細菌のリボソーム生合成に影響を与える因子で、リボソーム蛋白質・リボソーム RNA を修飾する酵素やリボソーム RNA を切断する酵素でないものが多く報告されるようになってきている。これらの因子は生体内でのリボソーム生合成において重要な役割を担うであろうとの期待からリボソームの <i>assembly factor</i> 等と呼びならわされている。しかしながら、実際にはこれらの因子はリボソームに対しある程度の親和性を持つ、もしくはその欠乏によりリボソームの前駆体が蓄積する、といった間接的な根拠にもとづいてリボソーム生合成への関わりを推測されているにすぎない。そのいずれもがリボソーム生合成のいかなる過程においてどのような機能を持つのかははっきりと示されてはおらず、リボソーム生合成にかかわる因子というよりはその候補と呼ぶのがふさわしい状態におかれているのである。本研究ではそのような候補のうちの一つ、RsgA の、リボソーム生合成における機能を分子レベルで明らかにした。RsgA はリボソーム 30S サブユニットによって活性化されるというユニークな特徴をもつ GTPase である。RsgA の欠乏が増殖速度の低下と 30S サブユニットの成熟障害を導く事が既に分かっていた。</p> <p>本研究ではまず大腸菌 <i>rsgA</i> 欠損株から、増殖速度を回復した復帰性変異株の単離を試み、複数得ることに成功した。これらを調べたところ全ての株の増殖回復はいずれも <i>rbfA</i> 遺伝子の変異によるものであった (<i>rbfA</i> は機能未知の 30S サブユニット結合因子をコードする遺伝子である)。全ての変異型 <i>rbfA</i> 遺伝子は、いずれも <i>rsgA</i> 欠損下における増殖に加えてリボソーム成熟を回復する能力を持っていた。これに加え、<i>in vitro</i> において RsgA は GTP 依存的に RbfA を 30S サブユニットから解離させる能力を持つことが分かった。変異型 RbfA 蛋白質を調べると、<i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> において、野生型 RbfA にくらべて 30S サブユニットから解離しやすい性質を持つことが明らかになった。これらの結果から、野生型 RbfA は RsgA によって 30S サブユニットから解離させられるようにできおり、変異型 RbfA は RsgA の介在なしに 30S サブユニットから解離する能力を得ているらしいことがわかった。さらに、成熟した 30S サブユニットと未成熟な 30S サブユニット前駆体を別々に精製し、RbfA あるいは RsgA との親和性を見たところ、RbfA はどちらのサブユニットに対しても同様の親和性を示したのに対し、RsgA は成熟した 30S サブユニットに対してのみ高い親和性を示した。また、RsgA は専ら成熟した 30S サブユニットと RbfA の複合体のみを高効率で解離させ、未成熟な 30S サブユニット前駆体と RbfA の複合体はほとんど解離させないことも確認された。</p> <p>本研究におけるこれらの発見は、RsgA の機能がリボソーム生合成の後期において RbfA を 30S サブユニットから解離させるというものであること、そして、RbfA の 30S サブユニットからの解離がリボソーム生合成の律速段階の一つであることを示している。すなわち本研究は、細菌のリボソーム生合成において、いわゆる <i>assembly factor</i> が関与する過程を初めて分子レベルで明らかにしたものである。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

リボソームは数十種類のタンパク質および RNA から成る巨大な複合体であるが、これが細胞内で組み上がるメカニズムについてはほとんど解明されていない。後藤は、大腸菌を用いてこの問題に取り組み、リボソーム 30S サブユニットによって活性化されるというユニークな特徴をもつ GTPase であり、その欠乏が増殖速度の低下と 30S サブユニットの成熟阻害を導くことが既に分かっていた RsgA に着目して解析を行い、以下の結果を得た。

- 1) RsgA を欠く大腸菌を変異原処理し、復帰性変異株を29株単離したところ、変異はすべて RbfA におちていた。変異を集約すると 8 種類であった。8 種類の変異の内訳は、6 種類がミスセンス変異、1 種類がナンセンス変異、1 種類が塩基欠失によるフレームシフト変異であった。8 種類の変異は RbfA の全長の様々な箇所位置しており、一次構造中、あるいは立体構造中の特定の部位に偏在している様には見えなかった。これらの変異株は増殖速度を回復しており、リボソームが野生型と同様に成熟した。さらに、これらの変異株では 30S サブユニットに結合した RbfA が減少していることを見いだした。一方、野生型 RbfA を過剰発現しても RsgA を欠く大腸菌の表現型は抑制されなかった。
- 2) RsgA と RbfA を組み換えタンパク質として精製し、精製した 30S サブユニットと混合する実験を行うことによって、RsgA には RbfA を 30S サブユニットから解離させる機能があり、逆に RbfA には RsgA の 30S サブユニットへの結合を促進する機能があることを見いだした。RsgA を欠く大腸菌の表現型を抑制した RbfA 変異体は、RsgA 非存在下でも 30S サブユニットから解離した。
- 3) さらに、成熟した 30S サブユニットと未成熟な 30S サブユニット前駆体を分離して調製することにより、RbfA は成熟した 30S サブユニットと未成熟な 30S サブユニット前駆体の両方に対して同様の親和性を示したが、RsgA は成熟した 30S サブユニットに対してのみ高い親和性を示すことを明らかにした。

以上の結果は、RsgA はリボソーム生合成の後期において RbfA を 30S サブユニットから解離させるという機能を持つこと、さらに、RbfA の 30S サブユニットからの解離がリボソーム生合成の律速段階のひとつであることを明確に示している

生体内におけるリボソーム生合成の全容はいまだその大半が未解明な状態のままであり、今後研究が加速していくと思われるが、本研究はその端緒と位置付けられる極めて重要な成果である。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成23年1月21日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。