

氏 名	む 武 藤 洋 樹
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 3287 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	分泌モニター SecM における翻訳伸長停止ステップの同定およびその解除に関わる分泌特性の解析
論文調査委員	(主 査) 教 授 杉 山 弘 教 授 藤 井 紀 子 教 授 秋 山 芳 展

論 文 内 容 の 要 旨

大腸菌の SecM は、その翻訳途上鎖がリボソーム内部のトンネルと相互作用する特異なタンパク質である。その C 末端付近には「アレスト配列」F¹⁵⁰ XXXXWIXXXGIRAGP¹⁶⁶があり、リボソームトンネルとの相互作用の結果、自らの翻訳伸長を一旦停止させる。SecM は分泌タンパク質であり、分泌が正常な場合アレストは一過性であるが、分泌欠損条件下ではアレスト状態が持続する。この性質によって、同一オペロンの下流遺伝子 *secA* (タンパク質膜透過駆動 ATPase をコードする) の翻訳調節を行う。また、SecM は、自らの分泌装置へのターゲティングにより、SecA の生合成を膜近傍に局在化することによって、SecA の機能的な構造へのフォールディングを助ける「シスシャペロン」機能も持つことが提唱されている。本研究において、申請者は SecA の発現が低温で上昇することに注目して、この調節における低温の感知に SecM 自身の分泌特性が関与することを明らかにするとともに、リボソーム翻訳伸長サイクルにおける SecM 翻訳アレストの作用点を明らかにした。また、ペプチジルトランスファー反応においてプロリンが特異な性質を持つことを提唱した。

申請者は、まず *in vivo* における SecM の翻訳アレスト解除が一次反応的に進行することを示し、その速度 (半減期) が 20℃ では 37℃ の 5 倍程度遅延することを見いだした。さらに、SecM の分泌過程を翻訳アレスト現象とは切り離して追跡し、SecM の分泌が他の表層タンパク質よりゆっくり起こること、20℃ では 37℃ より約 5 倍の遅延を示すことを示した。ゆっくりとした分泌は SecM のシスシャペロン機能の発現に役立っていること、そして低温でのさらなる分泌遅延はアレスト解除の遅延の原因となり、SecA の翻訳制御に寄与しているとの考察を行った。これは、低温で一般的な分泌遅延が起こるとの従来の考えに修正を迫り、SecM には低温を感知する能力が備わっていることを示唆するものである。また申請者は、SecM の翻訳伸長アレスト現象を *in vitro* 翻訳系にて解析し、SecM を翻訳中のリボソームは Pro166 コドンが A-site に位置した状態で停止すること、SecM ポリペプチド鎖の伸長が Gly165 までしか起こっていないこと、そして Pro166 コドンが指定する prolyl-tRNA がリボソームの A サイトで Gly165 からのペプチドトランスファーを受け付けない状態で存在することを明らかにした。申請者はさらに *in vitro* 翻訳実験の過程で、リボソームの P サイトに peptidyl-prolyl-tRNA が存在するとき、プロリンから A-site に位置するピューロマイシンへのペプチドトランスファーが起こりにくいことを発見し、リボソームのペプチジルトランスフェラーゼ活性中心による触媒がアミノ酸側鎖によって影響を受ける可能性を提起した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

近年リボソームが翻訳産物と相互作用することを示す知見が真核・原核生物を問わず報告されるようになった。その中でも、大腸菌の SecM タンパク質におけるアレスト配列とリボソームトンネルとの相互作用による翻訳伸長アレストは、タンパク質分泌の駆動モータータンパク質である SecA の発現調節という重要な生物学的役割を持つものとして、注目されている。しかしながら、翻訳伸長アレストがどのような分子機構により実現されているのかと言う重要問題は未解決であった。本申請論文における最も重要な貢献は、申請者の注意深く巧みな実験によって、翻訳伸長アレストを起こしたリボソームの状

態が解明されたことである。その結果、アレスト配列の最後の残基であるPro166まで翻訳が伸長して停止するという従来の予測とは異なり、翻訳は一残基手前までしか伸長していないこと、そしてPro166はポリペプチド鎖に取り込まれることなくフリーのprolyl-tRNAとしてリボソームのAサイトに結合し、伸長アレストに寄与しているとの驚くべき結論が得られた。この一連の実験を遂行するにあたり、申請者は様々な工夫を積み重ねている。例えば、精製した翻訳転写装置からなる「PURE SYSTEM」翻訳系の利点を活用して、翻訳終結因子を含まない翻訳反応系とナンセンスコドンを特定の部位に配置したmRNAを用いることにより、mRNA上のリボソームの位置を正確に決定することを可能にした。また、ペプチジル tRNA におけるアミノ酸と tRNA 間のエステル結合の pH 感受性を利用した 2 次元泳動法を開発することにより、伸長アレストを起こしたペプチジル tRNA のペプチド部分を単離し、解析することに成功した。本研究が発表された Molecular Cell 誌には前後して、SecM 翻訳アレストの機構を追求した論文が他に 2 報報告され、これらの研究結果と申請者の成果が合体してリボソームと相互作用する蛋白質研究の最先端を行くものとなったことは、極めて高く評価することができる。この中で、申請者はPro166コドンが、ポリペプチド鎖の一部となる前の素材を指定することに生物学的に意義をもつと言う、遺伝情報のあり方としては従来知られていなかった様式が存在を示したことは特筆に値する。また、申請者はプロリンからピューロマイシンへのペプチドトランスファー効率が例外的に低いとの、翻訳機構の理解に、より一般的に影響する知見も得た。これは、リボソームによって触媒されるペプチド結合の形成の効率がアミノ酸側鎖の性質によって影響される可能性を具体的に指摘した初めての報告として高く評価されるべき結果である。

一方、申請者はSecMの細胞内での挙動の解析も行い、SecMの分泌が他の表層タンパク質とくらべてゆっくり起こり、顕著な低温感受性を示すとの結果を得た。この研究では、SecMの局在性を直接的に調べられていない問題点をもつものの、申請者の考察はSecMの分泌特性をアレスト解除機構と低温感知機構と関連づけて巧みになされており、大腸菌細胞がどのように低温を感知してその分泌活性を制御しているのかに関して新たな問題点を提起したものとして評価することができる。

以上、本論文はSecMの翻訳伸長アレストとその解除のメカニズムについて、多くの独創的な結果を報告したものであり、リボソームにおける動的な機能制御という新たな研究分野に関して有益な情報を多くもたらした。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して認める。また論文内容とそれに関連した事項についての試問を行った結果、合格と認めた。