

氏 名 只 木 敏 雅

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第596号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 大腸菌におけるトランス・トランスレーション標的
タンパク質の同定

論文審査委員	主 査 教授	石濱 明
	教授	荒木 弘之
	教授	桂 勲
	教授	井口 八郎（京都大学）
	教授	藤山 秋佐夫（国立情報学研究所）

論文内容の要旨

原核生物で、tRNA と mRNA の機能の両方をもつ、tmRNA 名付けられた低分子 RNA が最近発見された。mRNA 翻訳過程で、蛋白合成が停滞した部位で、tmRNA がアラニンを付加した tRNA としてはたらき、その後翻訳装置が tmRNA 上に乗り移り、tmRNA 分子内部が mRNA となり翻訳を継続し、短いペプチドを付加したのち、tmRNA 上の停止コドンで翻訳を停止するものである。二分子の mRNA を単一の蛋白質に翻訳することから、この反応は、trans-translation と呼ばれるようになった。tmRNA でコードされたタグペプチド配列が、プロテアーゼの認識標的となることから、この反応は、不要蛋白を積極的に分解除去する、真核生物のユビキチン系に対応する原核生物の生体制御システムとして脚光を浴びている。しかし、タグペプチドを付加された蛋白は、プロテアーゼで急速に消化され短寿命であるので、大腸菌では、異種生物の蛋白を大量発現した時に確認されていたが、大腸菌自らの trans-translation 標的蛋白の同定は困難であった。

本研究は、この新規の蛋白消化システムの大腸菌自身の標的蛋白質を同定することを目指して実施された。この目標のために、tmRNA がコードするタグペプチドを、プロテアーゼに消化し難い人工配列に変えることに成功した。この蛋白の単離精製を容易にする目的で、さらに His タグを付加した。この tmRNA を大腸菌で発現させ、粗抽出液から His タグを利用して trans-translation を受けた蛋白群を分離した。分離蛋白群を二次元電気泳動法で分画し、タグに対する抗体で反応させると、多数の免疫反応を示す蛋白が同定された。各スポットから蛋白を抽出し、質量分析やアミノ酸配列分析で、その実体同定を試みた。こうした分析を重ねた結果、これまでに、富栄養 (LB) 培地培養大腸菌から単離されたタグ付加蛋白としては、TnaA (tryptophanase), Fba (fructose-1,6-bisphosphate aldolase), GatD (galactitol-1-phosphate 5-dehydrogenase), YfiA (ゲノム配列から存在が予想された生理機能未同定蛋白のひとつ) などが、貧栄養最小培地培養でタグ付加された蛋白としては、MetE (5-methyltetrahydropteroyl triirglutamate-homocysteine methyltransferase) が同定された。タグ付加蛋白の見掛け上の分子サイズから推定して、多くは、mRNA 翻訳終結点付近で翻訳装置が tmRNA へ乗り換えを起こしたと推定されたが、少なくとも MetE は、その mRNA 翻訳途中で tmRNA への翻訳切り換えが起きていることが判明した。

原核生物の遺伝子発現制御の一様式として、翻訳を中断して、新生蛋白を選択的に消化する必要が生じた時の処理機構としての生理機能が推定されている、trans-translation 現象が発見され、tmRNA が主要な役割を果たしていることが、

異種蛋白発現系での観察を根拠に提唱されていたが、これまで自己の蛋白がこの機構で処理されているかどうかは、不明であった。本研究によって、プロテアーゼ消化に対して抵抗性となった変異タグを付加することで、その存在が始めて実証された。今後更に、多数の変異タグ付加蛋白の分析を進めれば、trans-translationの標的遺伝子の系統的同定が可能であり、大腸菌での、不要蛋白処理機構の全貌解明が可能となる。

論文の審査結果の要旨

学位論文公聴会の直後、講演内容を巡って公開質疑討論が実施された。引き続き、非公開の学力確認試験を実施した。公開討論での応答を含めて、学位論文記載内容に関連した知識や、研究の背景などについては、基礎的理解を備え、また本研究に含まれる問題と今後の研究方針についても、妥当な考察をした。従って、学位を授与する基準の学力を備えていると判断された。

原核生物の遺伝子発現制御の一様式として、翻訳を中断して、新生蛋白を選択的に消化する、trans-translation があり、その過程では mRNA が主要な役割を果たしていることが最近発見された。この発見は、異種蛋白発現系での観察を根拠に提唱されていたが、学位論文申請者は、プロテアーゼ消化に対して抵抗性となった変異タグを付加することで、大腸菌自身の蛋白がこの消化システムの標的になることを見事に実証した。大腸菌における trans-translation の標的蛋白質の系統的・組織的同定の先駆けとして、高く評価される研究に発展させられるであろう。拠って、本論文の内容は、学位を授与するに相応しいと判定された。

なお、申請者には、修士課程で実施した研究の英語論文があり、また、本研究過程で発表された数編の共著英語論文の、自らが担当した部分の実験については、自ら執筆していることを考慮し、英語能力についても、学位授与水準の能力を備えていると判断した。