



Title	Studies on the Eukaryotic Ribosomal Exit Tunnel Function in Nascent Peptide-Mediated Ribosome Stalling [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高松, 世大
Citation	北海道大学. 博士(生命科学) 甲第13953号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/78046">http://hdl.handle.net/2115/78046</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Seidai_TAKAMATSU_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏名 高松世大

審査担当者	主査	教授	内藤	哲
	副査	教授	加藤	敦之
	副査	准教授	千葉	由佳子
	副査	助教	山下	由衣(農学研究院)

### 学位論文題名

#### Studies on the Eukaryotic Ribosomal Exit Tunnel Function in Nascent Peptide-Mediated Ribosome Stalling

(新生ペプチド鎖が司るリボソーム停滞における真核生物リボソーム出口トンネル機能の研究)

#### 博士学位論文審査等の結果について(報告)

かつてリボソームにはタンパク質合成装置としての機能しか考えられていなかったが、近年の研究により、翻訳途上のペプチド鎖が、自身を合成中のリボソームに作用して翻訳を制御することが明らかになってきている。そのような制御性ペプチド鎖は、翻訳反応中に新生ペプチド鎖に依存的したリボソーム停滞(nascent peptide-mediated ribosome stalling; NPmRS)を誘導し、停滞したリボソームによって後続のリボソームによる翻訳が阻害される。

翻訳伸長反応において、新たなペプチド結合はリボソーム大サブユニットに位置するペプチジルトランスフェラーゼセンターで形成され、合成された新生ペプチド鎖は大サブユニットを貫く「出口トンネル」を通して排出される。出口トンネルはおよそ100 Åの長さであり、内部に新生ペプチド鎖の30-40アミノ酸残基を収容する。多くの場合、制御性ペプチド鎖は20-30アミノ酸残基で構成され、出口トンネルの内部で機能してNPmRSを誘導する。出口トンネルの中ほどにはトンネルが狭まった部分があり、狭窄部位と呼ばれる。原核生物での遺伝学的研究と構造生物学的研究から、狭窄部位は新生ペプチド鎖と相互作用し、NPmRSにおいて「関所」として機能すると考えられている。しかしながら、真核生物では、新生ペプチド鎖と狭窄部位との相互作用についての遺伝学的証拠は得られていない。本学位論文は、真核生物のNPmRS系について、逆遺伝学に基づく生化学的な解析を行い、リボソーム狭窄部位の関与を明らかにしたものである。

第1章では、これまでに報告されている主なNPmRS系の知見がまとめられている。

第2章では、本研究に用いた制御性ペプチド鎖がシロイヌナズナのリボソームに対してNPmRSを誘導することを示した。研究対象としたNPmRS系は、真菌、ウイルス、動物、および植物という幅広い真核生物に由来し、制御性ペプチド鎖のアミノ酸配列や長さも異なる。このうちの4つは新生ペプチド鎖の長さが20アミノ酸残基以上であるが、別の1つは知られている中で最も短い6アミノ酸残基からなる新生ペプチド鎖に依存した制御である。

シロイヌナズナ野生型株から試験管内翻訳系(Arabidopsis Cell-free Extract; ACE)を調製し、試験管内翻訳を行った結果、制御性ペプチド鎖をコードするmRNAを翻訳させた場合には、新生ペ

プチド鎖依存的にペプチジル-tRNA が翻訳中間体として蓄積した。また、NPmRS に関わる uORF を含む 5'-非翻訳領域をレポーター遺伝子の 5' 上流に融合した場合には、リボソーム停滞によってレポーター遺伝子の発現が抑制されることを示した。これらのことから、解析した全ての NPmRS 系が ACE 翻訳系を用いた試験管内翻訳反応で再現されることを示した。

第 3 章では、NPmRS の誘導における出口トンネル狭窄部位の寄与を解析した。リボソームタンパク質 uL4 は出口トンネル内に突き出た  $\beta$  ループ構造をもち、リボソームタンパク質 uL22 の  $\beta$  ループとともに狭窄部位を形成する。シロイヌナズナでは、uL4 は *uL4A* と *uL4D* の 2 つの遺伝子によってコードされるが、これらの 2 重欠損変異株は致死である。そのため、使用したシロイヌナズナ株では、*uL4D* 遺伝子の欠損変異株に、FLAG タグを融合した変異型 *uL4D* 遺伝子 (*uL4D:FLAG*) が導入されている。本研究では 2 種類の *uL4D* 変異体を使用した。これらは  $\beta$  ループの頂点近傍に 1 アミノ酸置換 [*uL4D(R77A)* 変異] あるいは 2 アミノ酸残基の欠失 [*uL4D(ATV)* 変異] をもっている。

まず、変異型 *uL4D:FLAG* タンパク質を持つリボソームのポリソームへの結合を解析し、変異型リボソームが野生型リボソームと同等の翻訳活性を持つことを示した。また、変異型 *uL4D:FLAG* を発現するシロイヌナズナ株では *uL4D* 欠損変異株の表現型が相補されることから、変異型リボソームが細胞内で機能していることを示した。次に変異型 *uL4D:FLAG* を発現するシロイヌナズナ株から ACE 翻訳系を調製して試験管内翻訳を行い、NPmRS に対する *uL4D* 変異の効果の評価した。その結果、20 アミノ酸残基以上からなる 4 つの制御性ペプチド鎖では、*uL4D(ATV)* 変異をもつリボソームで NPmRS が弱まることが示され、そのうち 2 つでは *uL4D(R77A)* 変異によっても抑制された。このような 2 種類の *uL4D* 変異の効果における質的な違いは、構造生物学的研究の結果とも一致した。これらの結果から、解析した NPmRS 系が実際に *uL4D* 変異によって抑制されることを示した。さらに、*uL4D(ATV)* 変異の影響は新生ペプチド鎖ごとに量的な違いを示し、これは、未だ立体構造が報告されていない NPmRS 系を含め、狭窄部位における新生ペプチド鎖の空間的な位置関係を反映した相互作用の強弱に起因するものと考察した。一方、6 アミノ酸残基からなる NPmRS には、いずれの *uL4D* 変異も影響しなかった。6 アミノ酸残基では新生ペプチド鎖が狭窄部位に届き得ず、狭窄部位との相互作用とは別の機構で NPmRS が誘導されるものと考察した。

第 4 章では総合考察を行った。本研究により、新生ペプチド鎖が狭窄部位に届くに十分な長さを持つ NPmRS 系では、uL4 の  $\beta$  ループ構造を含む出口トンネル狭窄部位が NPmRS の誘導に必要であることを明らかにした。

これを要するに、著者は、新生ペプチド鎖に依存したリボソーム停滞におけるリボソーム出口トンネルの機能についての新知見を得たものであり、新生ペプチド鎖が司る翻訳制御の分子機構の解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。