

【学位論文審査の要旨】

1 研究の目的

大腸菌では約 4,400 個の全遺伝子の中で、生育に必須な全遺伝子約 300 個が同定され、現在までにそれらの機能も明らかになっている。論文著者の所属する分子遺伝学研究室では、機能未知であった必須遺伝子 *yqgF* について温度感受性変異株を単離して解析を行い、タンパク合成における転写の過程に欠損があることを見出した。その後バクテリアでは、転写は翻訳の影響を強く受けることが広く知られるようになり、転写の過程に欠損がある原因が翻訳の過程の欠損である可能性を考え、*yqgF* 温度感受性変異株 (*yqgF^{ts}* 株) におけるリボソームについて調べた結果、非許容温度ではリボソーム RNA (rRNA) の 16S rRNA の前駆体 (pre-16S rRNA) が蓄積することがわかり、*yqgF* 遺伝子がリボソーム RNA のプロセシングに関与することが明らかになった。

翻訳の場であるリボソームは大腸菌の場合、53 種類のリボソームタンパク質 (サブユニット) と 3 種類の rRNA (16S、23S、5S) から構成されている。生体内におけるリボソーム形成については、まだ完全に解明されているとは言えないが、rRNA については一つの rRNA 前駆体から種々の RNase によるプロセシングによって、3 種類の rRNA (16S、23S、5S) が作られることが報告されている。*yqgF^{ts}* 株で蓄積した pre-16S rRNA について調べられた結果、16S rRNA の 5' 末端側がプロセシングされていないものが同定された。また *yqgF^{ts}* 株から精製した pre-16S rRNA を含むリボソームを基質にした時に、精製した YqgF タンパク質によるプロセシングが *in vitro* で見られた。本研究ではこれらの先行研究を基に、YqgF タンパク質の生化学的、生物学的機能を詳細に解明することを目的に研究を行なった。

2 研究の方法と結果

最初に YqgF タンパク質によって生じるプロセシング末端の定量的解析を行った。先行研究では RACE 法により YqgF タンパク質が 16S rRNA の 5' 末端側のプロセシングに関与する事が示されていたが、プロセシングされる位置と量がはっきりしていなかったため、本研究では primer extension 法により定量的な解析を行った。その結果、YqgF タンパク質は pre-16S rRNA の 5' 末端側のほぼ 16S rRNA の末端にあたる部分をプロセシングすることが明らかとなった。

次に他の RNase との関係について調べた。16S rRNA の 5' 側は 3 種の RNase (RNase III, RNase G, RNase E) によって段階的にプロセシングされるとの報告が既にあるため、これらの RNase との関係について調べた結果、生育に必須な RNase E を除く、RNase III, RNase G の欠失変異によっては YqgF タンパク質によるプロセシングや *yqgF^{ts}* 株の生育には影響が見られず、YqgF タンパク質はこれらの RNase とは独立して機能することが明らかになった。

また YqgF タンパク質の RNase 活性について調べた。先行研究ではリボソーム中の pre-16S rRNA を基質とするプロセシング活性が *in vitro* で検出されたが、RNA のみを基質にした時には活性が見られておらず、YqgF タンパク質が RNase であることがはっきりしていなかつ

た。そこで反応条件を詳細に検討した結果、 Mn^{2+} イオン依存的な RNase 活性が同定され、YqgF タンパク質が RNase であることが明らかになった。

さらに YqgF タンパク質の生物学的機能についても調べた。*yqgF^{ts}* 株のプロテオーム解析を行い、コード領域中に SD 様配列を持つ遺伝子から作られるタンパク質の量が少ない傾向にあることを見出し、SD 配列との相互作用を介して翻訳に必須な働きをするリボソームの S1 サブユニットが欠損している可能性が示唆された。先行研究により *yqgF^{ts}* 株のリボソームでは S1 サブユニットの量が減少していることが示唆されていたが、S1 サブユニット以外のサブユニットの量については調べていなかったため、S1 サブユニットの量が特異的に減少していることは示せていなかった。そこで *yqgF^{ts}* 株のリボソームについてプロテオーム解析を行ったところ、検出できた他のサブユニットについては特に顕著な量の違いは見られなかったのに対して、S1 サブユニットについては大きく減少していることが明らかになった。

また 16S rRNA の 5' 末端側領域の生物学的な機能を明らかにするために、この領域を欠失した株を作製して調べた結果、生育が低温感受性になる事を見出した。低温で培養した時のこの株におけるリボソームを解析した結果、16S rRNA の異常なプロセシングが起り、また 30S リボソームが不活化していることが示唆され、16S rRNA の 5' 末端側領域はリボソーム形成時の異常なプロセシングを防ぐ役割をしていると考えられた。

3 審査の結果

これまで大腸菌の 16S rRNA の 5' 末端側については、RNase III, RNase E, RNase G によって段階的にプロセシングされると考えられてきた。しかし本研究では、少なくとも RNase III, RNase G とは独立に、RNase 活性を持つ YqgF タンパク質によってプロセシングされることを示した。また 16S rRNA の 5' 末端側のプロセシングの生物学的な意義についてはよくわかっていなかったが、本研究では 16S rRNA の 5' 末端側がプロセシングされないと、リボソームの S1 サブユニットがリボソームに結合できなくなることを示した。これまでに明らかになっている、 Mn^{2+} イオン非存在下で YqgF タンパク質はリボソーム中の pre-16S rRNA を基質にプロセシングすること、S1 サブユニットが結合しないリボソームは十分な翻訳活性を持たないことを考えると、生体内におけるリボソーム形成において、形成途中はリボソームが不活性状態で存在し、形成過程の最後において YqgF タンパク質により 16S rRNA の 5' 末端側をプロセシングされてリボソームが活性化することが示唆された。つまり YqgF タンパク質は、形成過程の最後に不活性型リボソームを活性型にするスイッチの役割をしていると考えられる。また本研究により、プロセシングされる pre-16S rRNA の 5' 末端側は、リボソーム形成時の異常なプロセシングを防ぐ役割をしていることを示唆する結果も得られた。これらは従来の 16S rRNA の 5' 末端側のプロセシングについての理解を根底から覆す画期的な研究であると言える。これらの研究成果の一部はすでに国際雑誌に発表され、国際的にも高く評価されており、本論文は博士（理学）の学位に十分値す

るものと判定した。

4 最終試験の結果

本学の学位規定に従って、試験および試問を行った。公開の席上で論文内容の発表を行い、生命科学専攻教員による質疑応答をもって試験とした。また、論文審査委員による本論文および関連分野の試問を行った。その結果、専門科目および外国語について十分な学力があることを認め合格と判定した。