

論文の要約

報告番号	甲 第 1231 号	氏名	鈴木 翔
学位論文題目	植物細胞質翻訳系のペプチド伸長におけるGTP リサイクル機構の解析		
<p>翻訳では、リボソームが反応の場となり、tRNAと様々な翻訳因子がATPおよびGTPの加水分解エネルギーを駆動力として機能し、開始、ペプチド伸長および終結の各反応が進行する。一方、タンパク質合成効率が高いことで知られるコムギ胚芽無細胞翻訳系では、翻訳に必須とされるGTPを反応液に添加しない条件においても翻訳活性を維持できるという現象が確認されている。本論文では、添加GTPを必要としない翻訳システムの分子機構の解明を目的として、主にイネ培養細胞（カルス）を材料とした生化学的手法に基づく研究を遂行し、この独自の実験系で得られた結果を踏まえ、想起するに至った新たな仮説の提唱を試みた。</p> <p>第1章では、研究背景と目的を概説する。背景として、コムギ胚芽無細胞翻訳系において確認されていたGTP無添加条件における翻訳活性維持の分子機構について記述し、同時に既知の文献情報に基づき各翻訳因子の機能へのGTPの寄与について解説している。また、コムギ同様に単子葉植物であるイネ (<i>Oryza sativa</i> cv. Nipponbare) について、その種子杯盤由来のカルスを材料とする系が、生化学的研究を遂行する上でコムギより多くの長所を有する点を述べた。</p> <p>第2章では、本研究を遂行するために、新規にイネのカルス由来の無細胞翻訳系を構築した実験について記述している。この系を用いることにより、GFPやDsRedに加えて分子量100 kDaを超えるヒト心筋イオンチャネルタンパク質hERGなどが合成可能な点を示し、無細胞翻訳系としての有用性を述べている。さらに、イネカルス抽出液においても、コムギ胚芽抽出液と同様にGTP無添加条件下での高い翻訳活性が確認されたことを示している。</p> <p>第3章では、まずmRNA分解物GMPから細胞抽出液内在性酵素によりGTP再生が起り得ることを示した。続いてGMPを起点とするGTP再生系を排除する目的で、poly(U)を鋳型としたpoly(Phe)生成を伴うペプチド伸長反応系の解析を実施し、ここでもGTP無添加条件でのペプチド伸長活性を確認し、mRNA分解物に起因するGTP再生はペプチド伸長には不必要と結論づけている。この結果を受け、遊離GTPを必要としない翻訳のメカニズムを解明するために、イネカルスより翻訳伸長因子eEF1A、eEF1BおよびeEF2を精製し、ペプチド伸長反応の部分再構成系による添加GTPの影響の解析を進め、その結果と考察を述べている。この再構成系では、ペプチド伸長活性にはGTP添加が有効である一方で、eEF1AのGTP交換因子とされているeEF1B添加による活性への影響が小さいこと、GTPではなくGDP添加でも活性が確認されることを示した。</p> <p>第4章では、GDP/GTP交換反応以外にも、翻訳因子上のGTP再生メカニズムがあると予想し、リボソーム由来NDPK (rNDPK) による翻訳因子結合GDPの因子上での再生系が存在するという仮説を立てた。本章では、実際に精製した80Sリボソーム上にrNDPK活性が存在することを実験的に示した上で、前述の仮説の実証を目的とする実験、その結果および考察について記述している。仮説の実証をめざして試みた実験では、GDPをプレチャージした翻訳因子の添加がペプチド伸長反応活性を顕著に増加させることなどについて考察している。次に、rNDPKが翻訳因子eEF1Aに結合するGDPをGTPへ再生する行程に作用する可能性について調査したところ、遊離GDPを基質とした反応条件よりも、GDPプレチャージ後に精製したeEF1Aを基質とした条件の方に高いGTP生成活性を確認し、rNDPKは遊離GDPよりもeEF1A結合GDPに対して高い親和性を有することを示唆する結果を得たことを踏まえ、仮説を支持し得る現象として考察した。</p> <p>第5章では、本研究の総括および今後の展望を述べている。本論文では、イネカルスを材料とした無細胞翻訳系の構築が可能なこと、またコムギ胚芽抽出液と同様に、GTP添加が不要なタンパク質合成活性がイネにおいても共通に見られる点を明らかにした。さらに、部分再構成系の構築により、翻訳因子上でのGTP再生系の分子メカニズムに独自の仮説を提唱するに至った。一方、この仮説を実証するためには、いくつかの課題が残されている。今後の展望として、rNDPKの分子同定などを中心に、仮説を確固たるものとするために必要な課題について考察した。</p>			