

論文の内容の要旨

論文題目 カタログ化 cDNA を用いたミトコンドリア
局在タンパク質の同定

指導教官 菅野純夫

東京大学大学院医学系研究科

平成12年4月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 富樫 卓志

ミトコンドリアは、好氣的な ATP の産生に携るばかりでなく、脂質・ヘム・アミノ酸・鉄-硫黄クラスターなどの生合成にも関わる重要な細胞内小器官である。また、最近の研究から、ミトコンドリアは細胞死のシグナルにおける中心的な細胞内小器官であることも明らかになってきた。

ヒトのミトコンドリアタンパク質は、1,000~2,000 種類、もしくはそれ以上存在すると考えられているが、ヒトのミトコンドリアに含まれるタンパク質のうち、ミトコンドリア DNA は内膜の呼吸鎖を構成するわずか13種類をコードしているに過ぎない。すなわち、ミトコンドリアを構成するタンパク質の大部分は、核がコードしている。しかしながら、それらの核にコードされるミトコンドリアタンパク質の大部分は、ほとんど研究されていない。そのため、ミトコンドリアの機能全体を分子レベルで理解するには、核がコードする未知のミトコンドリアタンパク質を同定し、ミトコンドリアを構成する因子をすべて明らかにする必要がある。

ミトコンドリアを含めた細胞内小器官に局在するタンパク質を網羅的に同定するためには、生化学的手法が広く用いられている。しかし、この生化学的な手法は、目的とする細胞内小器官を含む画分の

精製工程において、コンタミネーションの可能性を完全に排除することができない。そのため、さらに細胞生物学的な手法を用いた確認が必要となる。他方、細胞内局在予測プログラムといった *in silico* 解析手法の出現は、ミトコンドリアタンパク質を含めた細胞内小器官に局在するタンパク質を同定する実験以外の方法論について、その導入を促している。その他、cDNA を利用し、細胞生物学的手法を用いた細胞内局在情報の取得も考えられるが、これまでは、機能が分かっていないタンパク質をコードする大量の完全長 cDNA 資源がなく、その実現は難しかった。

近年の急速なヒトゲノム塩基配列の解析により、遺伝子予測プログラムや他生物とのゲノム比較解析などによる遺伝子探索が精力的に行なわれるようになった。また、大規模 cDNA の塩基配列決定により、多くのヒト遺伝子の構造が明らかになってきた。また、鈴木らによってオリゴキャッピング法が開発され、その方法をもとに作製した cDNA ライブラリーより、ヒト完全長 cDNA クローンの膨大なコレクションが作り上げられており、cDNA 資源の中でも、独創的なコレクションとして注目されている。これらのクローンは完全長 cDNA であるので、タンパク質をコードする塩基配列 (ORF) がすべて含まれており、そのままタンパク質の発現系に使用可能な cDNA 資源である。また、これらのクローンは DDBJ データベースにカタログ化されて約 28,000 クローン登録されており、大規模な外来性タンパク質を用いたミトコンドリアを含む細胞内小器官の局在情報の取得などの大規模な機能解析に有用である。さらに、遺伝子工学における技術革新により、サブクローニングをハイスループトに行なうことができる方法が開発され、その方法は大規模かつ網羅的な機能解析に応用されつつある。したがって、現在では cDNA 資源を利用した大規模な遺伝子機能解析を行なう条件がようやく揃ってきたといえる。

私は cDNA 資源を利用したミトコンドリアタンパク質の効率的な同定を行なうために、まず哺乳動物細胞発現クローン作製系を構築した。すなわち、ハイスループトなサブクローニングシステムである GATEWAY システムに対応した発現タンパク質の C 末端に蛍光タンパク質である EYFP がタグとして融合する哺乳動物発現ベクターである pDESTMCYFP を作製し、オリゴキャッピング法で作製した完全長 cDNA クローンをほぼ DDBJ の登録順に選択・使用して、哺乳動物細胞発現クローンを作製した。

次に、上述の戦略に基づいて作製した発現クローンの特徴を有効に活用して、ミトコンドリアに局在

するタンパク質を迅速に選び出すために、細胞生物学的手法を用いたスクリーニングおよび同定を行ない、最終的に約 3,000 種類の標識融合タンパク質を用いて、ミトコンドリアに局在する 39 種類のタンパク質をコードする発現クローンを得た。

また、本研究で得たクローンの内訳は、RefSeq に登録されているヒトタンパク質のアミノ酸配列と完全に一致もしくは、部分的に一致するものは 34 種類あり、その中で、文献検索と合わせて細胞内局在情報に関しての記載があるものは 17 種類であった。さらに、17 種類に関する細胞内局在情報により、ミトコンドリアに局在情報があるものは 12 種類あり、そのうちの 2 種類がスプライシング・バリエーションであることがわかった。また、ミトコンドリア以外の局在情報が主となるのは 5 種類あり、そのうち 2 種類がスプライシング・バリエーションであった。すなわち、残りの 22 種類がこれまで局在情報がまったく明らかになっていないクローンであった。また、この 22 種類のタンパク質のうち、そのアミノ酸配列が RefSeq に登録されたものと同一のものは 10 種類、その一部が一致するものは 7 種類、まったく登録されていないものは 5 種類であった。

さらに、EYFP 融合タンパク質の発現によって得られた新規ミトコンドリアタンパク質の局在情報を確認するため、C 末端 EYFP タグを 14 アミノ酸残基からなる V5 エピトープタグに変換し、2 重染色によって、発現タンパク質の細胞内局在の確認を行なった。その結果、EYFP から V5 へのタグの変換により、3 種類のクローンはミトコンドリアとミトコンドリア以外にも局在することが新たに分かったが、22 種類すべてがミトコンドリアに局在することを確認した。

ヒト遺伝子の総数は 35,000 程度と見積もられており、その中からミトコンドリアタンパク質を網羅的にかつ迅速に同定するために、細胞内局在予測プログラムのような *in silico* 解析を利用できれば、効率を考慮するとかなり有効である。そこで、まず、この目的のために現在利用可能なプログラムが十分に使えるかどうかを確かめるべく、今回新たに同定したミトコンドリアタンパク質のアミノ酸配列を利用して、細胞内局在予測プログラムで予測される局在との比較を行なった。使用したプログラムは、PSORT, TargetP, iPSORT, MitoProt である。また、MitoProt, TargetP の閾値は 0.5 とした。その結果、4 つのプログラムのいずれかで予測されたクローン数は 14 クローンで、全体の約 64%であり、新規に同定した 22 種類の

ミトコンドリアタンパク質には、細胞内局在予測プログラムでミトコンドリアに局在することを予測できないクローンが多数存在することが明らかとなった。

今回、実験によって新たにミトコンドリア局在が確かめられたクローンの中で、現在利用可能な予測プログラムにおいてミトコンドリアに局在すると予測されなかったものについて、その遺伝子産物の構造上の特徴を調べるために、2次構造の *in silico* 解析を行なった。膜貫通領域を予測するプログラム SOSUI で、膜タンパク質であるかどうかを解析した結果、同定した 22 種類のミトコンドリアタンパク質において細胞内局在予測プログラムによる解析で、ミトコンドリア局在を予測できなかったクローンのうち半数以上が膜貫通領域をもつタンパク質であることが明らかとなった。

私の系では、スクリーニングそのものに細胞生物学的手法を用いるため、ミトコンドリアに局在するタンパク質を同定しながら、同時に、並行して、遺伝子導入・過剰発現による細胞および細胞小器官の形態変化を観察することができる。

AK096568 を HeLa 細胞に導入したところ、典型的なミトコンドリアの形態とは異なり、ミトコンドリアが比較的核周辺に分布し、ミトコンドリアのフィラメントが長く、よりフィラメントが強調されて見えることを観察した。また、AK001571 を HeLa 細胞に導入して 48 時間後に観察したところ、導入された細胞の多くが、遺伝子導入されなかった細胞とは異なり、核の凝集・断片化、および、ミトコンドリア膜電位の消失を引き起こした。

以上の結果は、私が同定したミトコンドリアタンパク質には、ある一定時間以上過剰発現した場合、ミトコンドリアの形態に影響を及ぼすタンパク質が 1 つ、細胞死を誘導するタンパク質が 1 つ存在することを示している。

本研究で報告したミトコンドリアタンパク質の同定は、私の目的の第一段階である。今後は、細胞死を誘導した AK001571 や、ミトコンドリアの形態変化に関連した AK096568 に関する機能解析はもちろんであるが、私の系で新たに同定したミトコンドリアタンパク質の全体について、相互作用するタンパク質の同定等により、機能解明を目指したい。