

審査の結果の要旨

氏名 富樫 卓志

本研究は細胞内小器官の1つであるミトコンドリアの機能を分子レベルで明らかにするために、ヒト完全長 cDNA を基盤とした細胞生物学的手法を用いてミトコンドリアタンパク質の網羅的な同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 網羅的な標的局在タンパク質の同定法としてほとんど行われていなかった細胞生物学的手法を用いてミトコンドリアタンパク質の網羅的な同定を行うべく、GATEWAY システムと呼ばれるハイスループットなサブクローニングシステムとヒト完全長 cDNA を利用した発現クローン作製系が構築された。さらに、上述の系に適合し、蛍光タンパク質をC末端に持つ融合タンパク質発現ベクター (pDESTMCEYFP)が作製された。

2. HeLa 細胞中に作製された発現クローンを導入し、発現が確認された約 3,000 種類の標識融合タンパク質とミトコンドリア特異的染色試薬 (Mito-Tracker Red)との 2 重染色によって、ミトコンドリアタンパク質をコードする発現クローンが 39 種類得られた。また、Blast 検索・文献検索により、同定されたクローンのうち 22 種類のクローンがこれまで局在情報が報告されていないクローンであることが示された。さらに、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じであるものは 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 種類であることが示された。

3. EYFP 融合タンパク質の発現によって得られた 22 種類の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 重染色による発現タンパク質の細胞内局在の確認を行った。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したが、22 種類すべてがミトコンドリアに局在することが示された。

4. 新たに同定した 22 種類の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 (PSORT、TargetP、iPSORT、MitoProt)で予測される局在との比較を行なった。4 つのプログラムのいずれかでミトコンドリアに局在すると予測されたクローン数は 22 クローン中、14 クローンであり、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示された。さらに、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 による解析の結果、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示された。

5. 同定されたミトコンドリアタンパク質の 1 つをコードする AK096568 を HeLa 細胞に導入し、ミトコンドリアの形態を観察した結果、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、より強調されており、ミトコンドリアの形態に影響を及ぼすタンパク質をコードするものが同定された 22 種類のクローンに含まれることが示された。

6. 同定されたミトコンドリアタンパク質の 1 つをコードする AK001571 を HeLa 細胞に導入して 48 時間後に観察したところ、遺伝子導入されなかった細胞とは異なり、導入された細胞の多くが、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。この結果より、細胞死を誘導するタンパク質をコードする cDNA が同定された 22 種類のクローンに含まれることが示唆された。

以上、本論文は完全長 cDNA を利用した細胞生物学的手法を用いた解析から、未知のミトコンドリアタンパク質多数同定し、その一部のタンパク質機能を示唆している。本研究はこれまでほとんど試みられていなかった網羅的な細胞生物学的手法を用いたミトコンドリアタンパク質分子の同定により、ミトコンドリアの分子レベルでの機能解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。