

論文内容の要旨

論文題目 哺乳動物ミトコンドリアリボソームにおける
RNA からタンパク質への機能移行の研究

氏名 寺崎 真樹

序論

タンパク質合成の場であるリボソームは RNA とタンパク質の複合体である。大腸菌リボソームでは RNA とタンパク質の比が 2:1 であり、約 70% を RNA が占めている。それに対して、哺乳動物ミトコンドリアリボソームでは RNA が大腸菌の約半分に短縮し、代わりにタンパク質成分が増加し、RNA とタンパク質の比は 1:3 へと完全に逆転している(表 1)。ミトコンドリアの起源が真正細菌であることを考慮すると、これは進化の過程において、RNA が担っていた機能的な役割をタンパク質が肩代わりしたことを示唆している。

また、ミトコンドリアリボソームは抗生物質に対する感受性などから細菌型リボソームに分類される。実際に *in vitro* でのタンパク質合成系においてミトコンドリアの翻訳因子(EF-Tu, EF-G, IF2 など)が大腸菌リボソームで働くことが知られている。その一方で、大腸菌 EF-G はミトコンドリアリボソームでは機能しないという事実も知られており、構成成分が全く異なる大腸菌とミトコンドリアのリボソームはある程度の機能的な互換性を示すものの、相違も見出される。本研究では、哺乳動物ミトコンドリアリボソームのタンパク質成分の解析を通じて、リボソームのアーキテクチャーにおける RNA からタンパク質への構造的及び機能的な役割委譲の可能性について検証することを目的とした。また大腸菌とミトコンドリアのリボソームの特異性を生かして、翻訳因子とリボソームの機能的な相互作用に関して新たな知見を得ることを目的とした。

表1 大腸菌とミトコンドリアのリボソームの比較

	prokaryote (<i>E. coli</i>)	mitochondria (Bovine)
Svedberge value (S)	70S (50S+30S)	55S (39S+28S)
Molecular weight (MDa)	2.3	3.5
RNA:protein (w:w)	2:1	1:3
LSU rRNA	23S (2904 bases)	16S (1571 bases)
SSU rRNA	16S (1541 bases)	12S (955 bases)
5S rRNA	5S (120 bases)	—
Ribosomal proteins	55 proteins	79 proteins

1. 哺乳動物ミトコンドリアのリボソームタンパク質の同定

解析を開始した当初は、哺乳動物ミトコンドリアリボソームのタンパク質成分は、わずか数種類が報告されているのみで、ほとんどのタンパク質が未同定であった。牛肝臓から単離した 55S ミトコンドリアリボソームのタンパク質成分を塩基性タンパク質の分離に優れるラジカルフリー高還元性二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(RFHR 2-D PAGE)によって分画し約 80 個のスポットを得た。各々のタンパク質スポットをトリプシンでゲル内消化し、液体クロマトグラフィー質量分析法によるプロテオーム解析を行い、ヒトおよびマウスの EST データベ

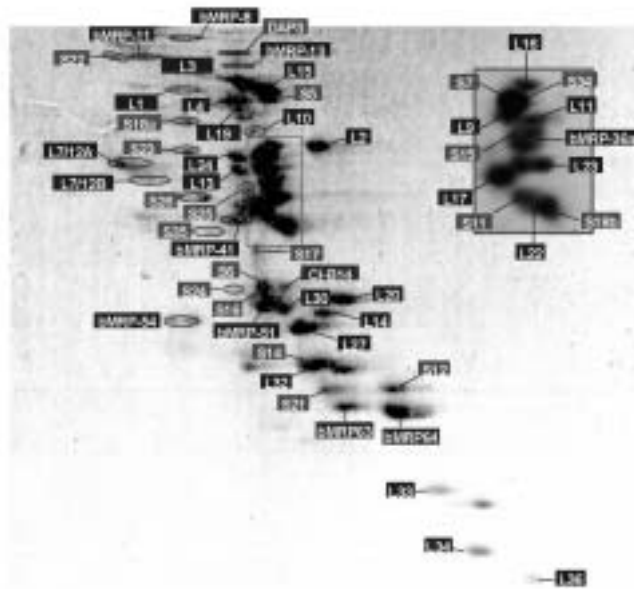


図1 同定したリボソームタンパク質(RFHR 2-D PAGE)

ースを検索することにより、新規なミトコンドリアリボソームタンパク質遺伝子を 55 種類同定することに成功した(図 1)。また、28S、39S それぞれのサブユニットに関して解析を行い、それぞれのタンパク質がどちらのサブユニット由来であるかを特定した。同時期に海外の二つのグループからミトコンドリアリボソームタンパク質の解析結果が報告され、最終的に 79 個の全タンパク質成分が決定された。配列の類似性から原核生物リボソームタンパク質のホモログは 44 種存在し、それ以外の 35 種はミトコンドリアリボソーム特異的なタンパク質であった。原核生物リボソームタンパク質のホモログに関して分子量を比較したところ、ミトコンドリアリボソームではリボソーム RNA が短縮した部分に結合するタンパク質成分が特異的に肥大化していることが明らかとなった。また、大腸菌とミトコンドリアのリボソーム RNA で機能的に重要な部位は保存されているが、このような部位に局在するタンパク質は分子量もほとんど変わらないという結果を得ている。このことは、RNA の短縮をタンパク質が肥大化することで構造的に補完していることを示唆している。

2. 哺乳動物ミトコンドリアリボソームと原核生物リボソームにおける翻訳因子の互換性

伸張因子 EF-G はリボソーム上でペプチド転移反応が生じた後に、次のコドン翻訳するために転座反応を触媒する G タンパク質である。ミトコンドリア EF-G は大腸菌リボソームで機能するが、大腸菌 EF-G はミトコンドリアリボソームでは機能しない。この一方向性の特異性がミトコンドリアリボソームのどのような性質によって決定されるのかを検証した。EF-G の特異性をリボソームとの相互作用によって誘起される EF-G の GTPase 活性を指標に評価したところ、ミトコンドリア EF-G は大腸菌とミトコンドリアの両方のリボソームによって活性化されるのに対し、大腸菌 EF-G はミトコンドリアリボソームによって活性化されないことが明らかとなった。このことから、EF-G の転座反応における特異性はリボソームとの相互作用によって誘起される GTPase の活性化の有無によって決定されていることが明らかとなった。さらに、リボソームにおいて EF-G と直接相互作用することが知られているストークタンパク質 L7/12 が単独で EF-G の GTPase を活性化させる機能を持つことが知られているため、大腸菌とミトコンドリアの L7/12 の組換えタンパク質を調製した。組換え L7/12 を用いて大腸菌とミトコンドリアそれぞれの EF-G に対する GTPase 活性を評価したところ、ミトコンドリア EF-G は大腸菌とミトコンドリアいずれの L7/12 でも同程度に活性化されるのに対して、大腸菌 EF-G は大腸菌 L7/12 に比べてミトコンドリア L7/12 では活性化が少ないという傾向がみられた。この結果から、EF-G のリボソームに対する特異性がリボソームとの特異性、すなわち L7/12 との機能的な相互作用によって決定されていることが示唆された。

次に、実際のリボソーム上においても L7/12 が特異性を決定しているのかを確かめるために、ミトコンドリアリボソームのうち L7/12 のみをミトコンドリアのものから大腸菌のものに置き換えたハイブリッドリボソーム(55Sh)を作製し、GTPase 活性を評価した。ミトコンドリア EF-G においては 55Sh でもミトコンドリアリボソームと同様の GTP の加水分解が確認されたが、大腸菌 EF-G においてはミトコンドリアリボソームでは活性化されなかったのに対して 55Sh では顕著な活性化が観測された。さらにポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成能についても評価を行った(図2)。ミトコンドリアリボソームに関しては、大腸菌とミトコンドリアいずれの EF-Tu を用いた場合でも、ミトコンドリア EF-G では機能するものの、大腸菌 EF-G では機能しなかった。それに対して 55Sh では、大腸菌 EF-G を用いた場合においても機能することができた。これは大腸菌 EF-G の GTPase が 55Sh によって活性化されていることと対応している。すなわち、ミトコンドリアリボソームの L7/12 のみを置換することによって EF-G に対するリボソームの特異性がミトコンドリア型から大腸菌型へと変化したことを示している。以上の結果は、たった1つのリボソームタンパク質 L7/12 を置換することによって、大腸菌とミトコンドリアのリボソームはお互いの EF-G を交換できることを示している。したがって、構成要素の全く異なる大腸菌とミトコンドリアのリボソームは全体としては機能的に等価であると結論できる。

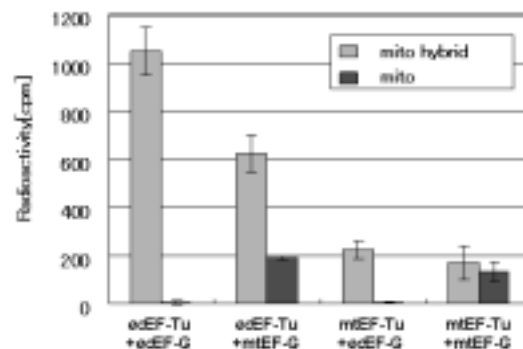


図2 poly(U)-polyPhe 合成能の特異性

さらに、大腸菌リボソームの L7/12 のみをミトコンドリア L7/12 に置換した大腸菌ハイブリッドリボソーム(70Sh)の作製を試みた。ところが、ミトコンドリア L7/12 では直接置換することができなかつたため、ミトコンドリア L7/12 のうちリボソームとの結合に関与する N 末ドメインのみを大腸菌のものに置き換えた L7/12 キメラタンパク質を作製しそれを用いることで、70Sh の作製に成功した。

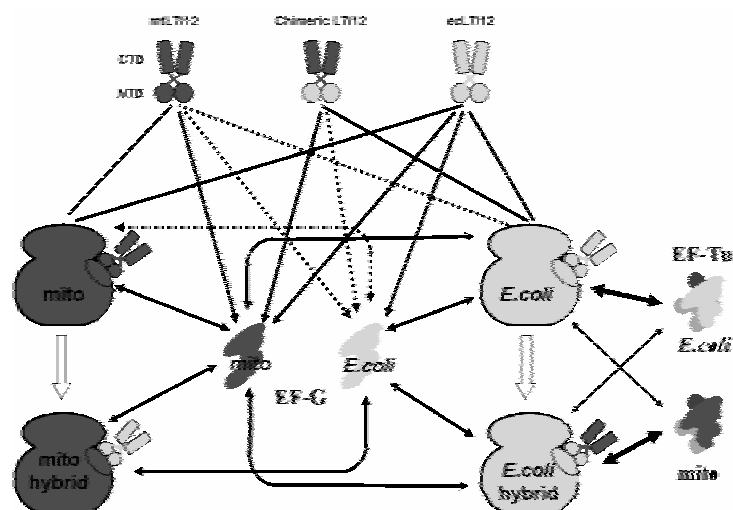


図3 哺乳動物ミトコンドリアリボソームと原核生物リボソームにおける翻訳因子の互換性

70Sh はポリウリジン依存ポリフェニルアラニン合成能において、EF-G に関しては大腸菌リボソームと同様の特異性を示したものの、EF-Tu に関しては大腸菌 EF-Tu を用いた場合に大腸菌リボソームよりも活性が低かったのに対して、ミトコンドリア EF-Tu を用いたときは大腸菌リボソームよりも活性が高いという特異性を示した。これは 70Sh のキメラタンパク質の C 末ドメインがミトコンドリアのものであることが EF-Tu の特異性に影響を与えた結果と考えることができる。これを検証するため、コドン認識依存的な EF-Tu の GTPase 活性を評価した。その結果、ミトコンドリア EF-Tu は 70Sh に対して高い活性を示した。これらの結果は、EF-Tu の活性化には L7/12 の C 末ドメインとの機能的な相互作用が重要であることを示唆している。

結論

哺乳動物ミトコンドリアのリボソームタンパク質の同定から、ミトコンドリアリボソームにおいてリボソーム RNA が短縮した部分に結合するタンパク質が特異的に肥大化していることが明らかとなった。この結果は、原核生物型リボソームにおいて RNA が担っていた構造的な役割をタンパク質が肩代わりしていると考えことができ、生命の初期進化における RNA ワールドから RNP(RNA+タンパク質)ワールドへの移行の必然性の実例であるとも捉えることができると考えている。

さらに翻訳因子との相互作用に関わるたった 1 つのリボソームタンパク質 L7/12 を置換することにより、大腸菌とミトコンドリアのリボソームはお互いの翻訳因子を交換できることを証明した。この結果は、完全に構成成分の異なる 2 つのリボソームが機能的にも等価であることを意味している。

また大腸菌ハイブリッドリボソームにおける解析から EF-Tu の機能発現には L7/12 の C 末ドメインとの機能的な相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。このようにミトコンドリアと大腸菌のタンパク質合成系を比較することはタンパク質合成の粗過程の解明に有用であるといえる。