

# 論文内容の要旨

## 論文題目 ミトコンドリアタンパク質合成系の分子機構

—ミトコンドリア RNA スクレオチジルトランスフェラーゼの同定及び機能解析—

氏名 永池崇

### 序論

ミトコンドリアは我々が活動するためのエネルギーの約 90% を供給する細胞内小器官である。ミトコンドリアには核とは独立したタンパク質合成系が存在し、電子伝達系サブユニットの内、13 種類のタンパク質を合成している。1981 年のヒトミトコンドリア (mt) DNA の配列決定以来、動物 mt 翻訳系の顕著な特徴が明らかとなった。それらは、異常な二次構造を持った tRNA、poly(A)配列の付加に伴う終止コドンの出現、先導配列のない mRNA などである。ところが、これら異常な RNA 分子がどのように翻訳に参加しているのかについては、多くが未解明のままである。細胞質では mRNA や tRNA の 3'末端の成熟化が翻訳に不可欠であるが、これはミトコンドリアでも同様であると予想される。本研究ではこれまで報告のなかった mt RNA の 3'末端成熟化を行う RNA スクレオチジルトランスフェラーゼの同定を試みることにした。本研究により、謎の多い mt 翻訳系の分子機構解明に大きく貢献できるのではないかと考えている。

### 1. mt CCA 付加酵素の精製及び同定

CCA 付加酵素は tRNA の 3'末端に CCA という全生物に共通の配列を付加する酵素である。CCA は tRNA におけるアミノ酸の受容位置であり、またリボソーム上で rRNA との間にワトソン-クリック塩基対を形成してペプチド転移反応を促進すると考えられている。さらに、tRNA のスクレアーゼに対する耐性を与える役割も持つ。mt tRNA の遺伝子には CCA がコードされていないため、CCA 付加酵素による付加が mt 翻訳系において必要不可欠である。

我々は mt CCA 付加酵素を同定するため、ウシミトコンドリアから精製することにした。4 段階のカラムクロマトグラフィーで部分精製した後、質量分析法により、遺伝子の同定に成功した (Fig.1)。アミノ酸配列の解析の結果、mt CCA 付加酵素はバクテリアの CCA 付加酵素と同一性が高いことが分かった。ミトコンドリアの祖先はバクテリアであり、mt タンパク質によく見られる特徴である。

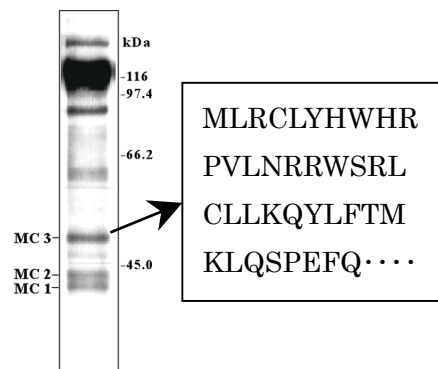


Fig.1 mt CCA 付加酵素の同定

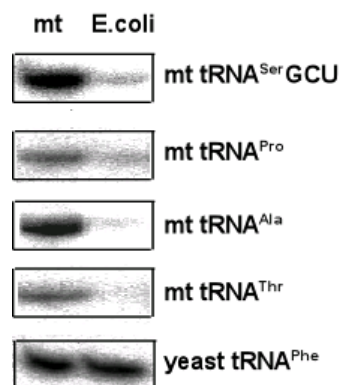


Fig.2 mt CCA 付加酵素の基質認識

## 2. mt CCA 付加酵素の基質認識

CCA 付加酵素は他の RNA/DNA ポリメラーゼと異なり、核酸性鋳型を必要とせずに、酵素単独で CCA という定まった配列を tRNA のみを基質として付加する大変ユニークな酵素である。本酵素は tRNA の T ループ内の保存配列を認識することが示唆されている。ところが、動物 mt tRNA の多くは、異常な構造を持っており、T ループの保存配列を有していない。これら異常な tRNA が mt CCA 付加酵素によってどのように認識されるのかを調べるため、ヒト mt 酵素の組み換え体を用いて CCA の付加効率を大腸菌 CCA 付加酵素と比較した。その結果、mt CCA 付加酵素は mt tRNA を効率よく修復するのに対して大腸菌 CCA 付加酵素では付加効率が著しく低かった (Fig.2)。このことから、mt CCA 付加酵素は大腸菌と異なり、T ループの保存配列を厳密に認識していないことが明らかとなった。しかしながら、T ループ全体が欠けた tRNA に対しては付加効率が顕著に下がるため、T ループの存在そのものは、mt CCA 付加酵素の認識に必要であることが示唆された。

## 3. ミトコンドリア病病因性変異を持つ mt tRNA における CCA 付加効率の低下

mt DNA の変異が様々なミトコンドリア病の病因になっていることは良く知られており、病因性変異のうちの 58% は tRNA 遺伝子中に存在している。よってそのような変異を持つ mt tRNA の機能解析はミトコンドリア病の病因を探る上で不可欠である。CCA 付加は前述のように、mt tRNA が機能するために必須のプロセスである。もし、変異により、CCA 付加が阻害されるとすれば、mt タンパク質合成過程に重大な影響を与えることになり、病因の一つとなることが予想される。そこで、本研究では二つの変異に注目することにした。一つは、幼児突然致死性症候群の病因である mt tRNA<sup>Gly</sup> 遺伝子の A10044G 変異、もう一つは乳児致死性心筋症の病因である mt tRNA<sup>Ile</sup> 遺伝子の A4317G 変異である。これらの変異はともに、CCA 付加酵素の認識部位である tRNA の T ループ上に存在しており、CCA 配列付加過程での効率の低下が発症の原因になっている可能性があると考え、CCA 付加酵素による反応効率を調べた。その結果、これらの変異型では野生型 tRNA に比べて CCA 付加効率が著しく低下していた。これら変異 tRNA の構造そのものが変化していたため、このことが分子レベルでミトコンドリア病の発症に関与している可能性が強く示唆された。

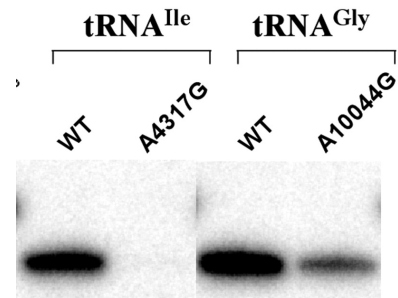


Fig.3 ミトコンドリア病病因性変異による、CCA 付加効率の低下

## 4. mt poly(A) polymerase の同定

poly(A) polymerase (PAP)による mRNA 3'末端への poly(A)配列付加の過程は、真核生物の場合 mRNA の核から細胞質への輸送、安定化、翻訳開始を促進し、原核生物では、mRNA の分解のシグナルとなる。mt mRNA にも poly(A)配列が存在し、前述のように poly(A)配列が一部の mt mRNA の終止コドンの出現に必要であることが示唆されているが、mt mRNA の安定化や翻訳に関与していることを直接示した報告はない。mt PAP を同定できれば、poly(A)配列の機能解

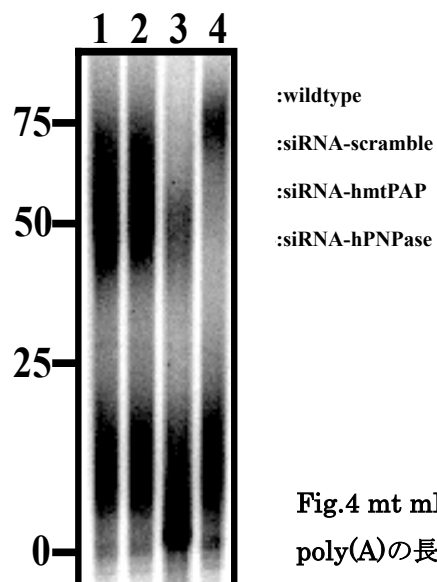


Fig.4 mt mRNA の poly(A)の長さの解析

析が可能になり、更に mt 翻訳系の制御機構に関する重要な知見が得られると考えられる。

我々は、mt PAP の同定のために mt CCA 付加酵素と同様、まずウシミトコンドリアからの精製を試みた。ところが、CCA 付加酵素と異なり、活性が弱くカラムクロマトグラフィーでは精製できなかった。そこでデータベースサーチで PAP ホモログの検索を行った。CCA 付加酵素と同様、バクテリア型の PAP ホモログがあると予想したが、そのような配列は存在しなかった。一般的に PAP ホモログを持たないバクテリアでは、Polynucleotide Phosphorylase (PNPase、エキソヌクレアーゼの一種で、逆反応のポリヌクレオチド合成反応も触媒する)が poly(A)付加を行っていることが知られている。ヒトにも PNPase のホモログ (hPNPase) が存在し、ミトコンドリアに局在することから、hPNPase がミトコンドリアで poly(A)付加を行っている可能性が考えられた。ところが、最近見つかった新規の細胞質 PAP ファミリーの中に mt 移行シグナルが付いた PAP ホモログを発見した (hmtPAP と命名)。そこで、GFP との融合タンパク質をヒトの培養細胞で発現させ、hmtPAP がミトコンドリアに局在することを確認した。次に RNAi で hmtPAP をノックダウンしたところ、mt mRNA の poly(A)の長さが顕著に短くなるため、hmtPAP が mt PAP であることが判明した (Fig.4 レーン 3)。一方、hPNPase をノックダウンすると、mt mRNA の poly(A)は短くなるどころが逆に長くなった (Fig.4 レーン 4)。このことから、細胞内では hPNPase は主にエキソヌクレアーゼとして機能していることが示唆された。

## 5. mt mRNA の安定性と poly(A)配列の関係

mt mRNA の安定性に poly(A)配列がどのように関わっているのかを解析するために、ノーザンブロッティングを行った。その結果 hmtPAP をノックダウンした細胞では、顕著に mt mRNA の定常量が減少していることが分かった (Fig.5)。このことから、ヒトミトコンドリアでは、細胞質と同様、poly(A)が mt mRNA の安定化に必要であることが示唆された。バクテリアや植物のミトコンドリアでは poly(A)が mRNA の分解を促進することを考えると、この結果は意外であった。

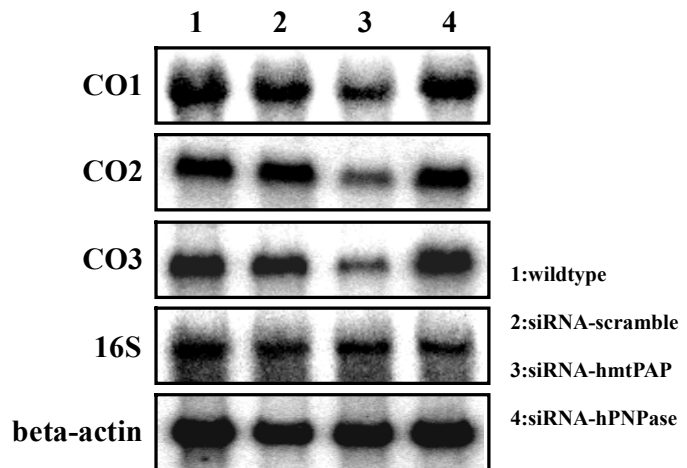


Fig.5 poly(A)と mt mRNA の安定性

## 6. mt PAP の mt タンパク質合成における役割

次いで mt PAP のノックダウンの mt タンパク質合成への影響をウェスタンブロッティングにより調べた。その結果、mt DNA にコードされているタンパク質が顕著に減少していた (Fig.6)。核 DNA にコードされている mt タンパク質の量には変化がなかった。このことから、hmtPAP もしくは poly(A)配列がミトコンドリアにおけるタンパク質合成に必要であることが示唆された。さらに、mt 活性への影響を調べたところ、mt 膜電位と酸素消費量が著しく低下しており (Fig.7)、mt タンパク質の減少と矛盾しない結果となった。

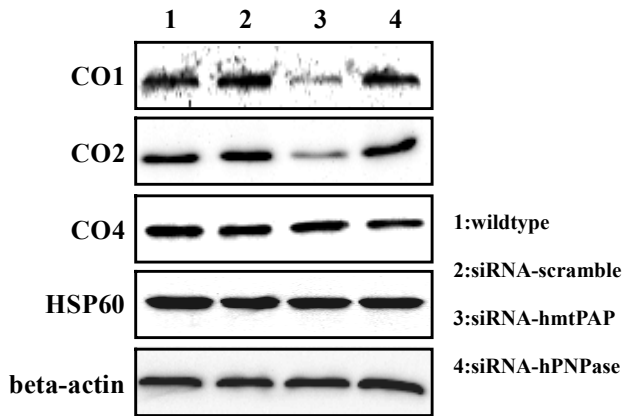


Fig.6 mt タンパク質合成系への影響

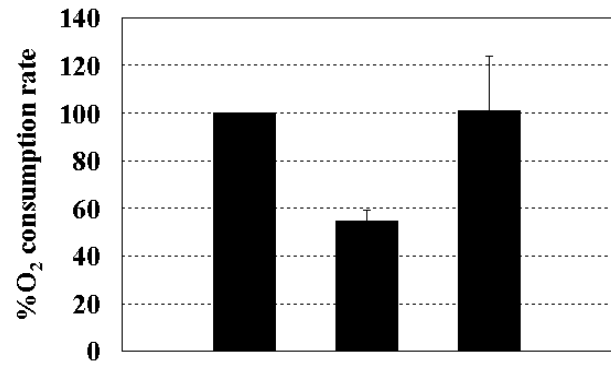


Fig.7 mt 活性 (酸素消費量) への影響

## 結論

mt RNA3'末端成熟化に関わる mt CCA 付加酵素と mt PAP の同定に成功した。mt CCA 付加酵素は異常な構造を持つ mt tRNA でも認識できることが分かったが、これはミトコンドリアと共進化したことによる結果であると思われる。一方、hmtPAP による poly(A)付加は終止コドンを作り出すだけでなく、mRNA の安定化に必要であることも分かった。したがって hmtPAP は mt タンパク質合成系において要となる因子に違いない。poly(A)付加が mRNA の安定化に関わるという結果は、動物 mt 翻訳系がバクテリアのみならず細胞質の翻訳系に似た一面も兼ね備えていることを示している。動物ミトコンドリアでは、進化の過程で DNA ゲノムが非常に縮小した結果、先祖であるバクテリアとは全く違ったユニークなタンパク質合成系を獲得するに至ったのだろう。