

## 論文内容の要旨

論文題目 : **Fluorescent Probes for Detecting Mitochondrial RNAs and Proteins**

(ミトコンドリアに局在する RNA と蛋白質の蛍光検出法)

氏 名 名 取 穰

### 【序】

ミトコンドリアは、外膜と内膜に囲まれた膜間腔 (IMS) と、内膜に囲まれたマトリックスの二つの空間から構成されており、マトリックス内にミトコンドリア独自のゲノム (mtDNA) を持つ細胞内小器官である。ミトコンドリアタンパク質には、mtRNA から翻訳されるタンパク質と、局在化アミノ酸配列に誘導されて細胞質から輸送されてくるタンパク質との2種類が存在する。

第一の研究として、mtDNA から転写されてくるミトコンドリア RNA (mtRNA) の検出法を開発した。また、第二の研究として、ミトコンドリア内の IMS への輸送を制御している、IMS 局在化アミノ酸配列の同定法の開発を目的とした。

### 【研究 1】 生細胞内におけるミトコンドリア RNA の可視化検出法の開発

#### 【背景】

従来の mtRNA の観察法には、細胞を破碎する分離精製法、または細胞固定化後の in situ ハイブリダイゼーション法が挙げられる。これらの方法では、生細胞内における mtRNA の動態をリアルタイムに観察することが不可能である。本研究で

は、mtRNA 検出プローブを開発し、生細胞内の mtRNA を可視化することで、ミトコンドリア内での局在場所や時間変化といった時空間情報を損なわずに mtRNA の動態を観察することを目的とした。

#### 【プローブの設計】

まず二つに分割して蛍光を失った蛍光タンパク質 (EGFP) の各々に、RNA 結合タンパク質の RNA 結合ドメイン (mPUM1, mPUM2) と、ミトコンドリア局在化配列を連結したプローブを作製した (図

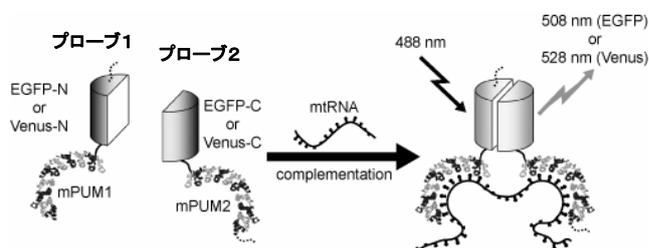


図1 mtRNA の検出原理

1). 両プローブが標的 RNA 一分子に結合した場合に、RNA-プローブ三元錯体が形成される。三元錯体形成によるプローブの近接により、分割 EGFP が近接相互作用を起こすことで蛍光が回復する。検出対象として、mPUM1 と mPUM2 が結合できる塩基配列を持つ NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6) のメッセンジャーRNA (mRNA) を選択した。

#### [プローブのキャラクタリゼーション]

ND6 の mRNA への選択性を確かめるために、細胞からプローブを分離精製し、結合していた RNA を調べた。その結果、両プローブともに ND6 の mRNA が結合していたが、結合配列を持たない NADH dehydrogenase subunit 1 の mRNA は結合していなかった。次に、プローブを発現させた細胞の蛍光強度を、フローサイトメーターを用いて測定した。

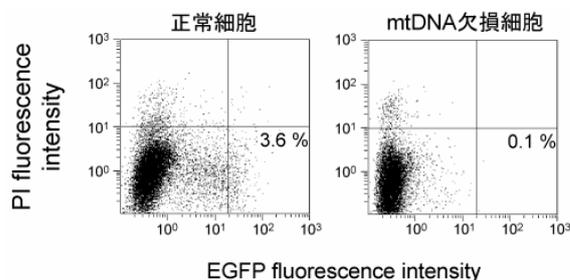


図2 プローブ蛍光回復の mtRNA 依存性

mtDNA を持つ細胞からは蛍光性の細胞集団が観測されたが、mtDNA 欠損細胞からは蛍光性の細胞が観測されなかった (図2)。この結果は、細胞が蛍光性となるためには、細胞内に mtDNA (mtRNA の設計図) が必要であることを示している。結果をまとめると、プローブは ND6 の mRNA に特異的に結合し、蛍光を回復させていることが分かった。

#### [ミトコンドリア内におけるミトコンドリア RNA の局在]

次に、ミトコンドリア内における mtRNA の局在を観察した。本プローブの蛍光の回復は付加逆であるため、mtRNA から解離したプローブも蛍光性のままとなる。従って、プローブの蛍光の分布が、ND6 の mRNA の局在を反映していない可能性が考えられる。この影響を避けるために、まず全ての蛍光性プローブの蛍光団を強力な励起照射で破壊した。その後、新たに蛍光が産生されてくる場所を蛍光顕微鏡にて観察する fluorescence recovery after photobleach (FRAP) 法を用いて、mtRNA の局在場所を特定した。短時間での観察を行うために、蛍光団形成の早い蛍光タンパク質 (Venus) を用いたプローブを使用した。観察の結果、mtRNA の産生場所である mtDNA 上だけではなく、mtDNA が存在しない場所からもプローブの蛍光の産生が見られた。従って、ND6 の mRNA は mtDNA で合成された後に分散して、ミトコンドリア全体に局在すると考えられる。

#### [ミトコンドリア RNA の動態観察]

ND6 の mRNA が分散していく過程を観察するために、FRAP 法を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。今回は、長時間の観察が必要であるため、長時間励起に耐性のある EGFP タイプのプローブを用いた。直径 4 μm の円状に強力な励起光照射を行い、局所的にプローブの蛍光をブリーチした。その後、ブリーチ領域内の蛍光強度の経時変化を追った。30 分間の測定の結果、ブリーチ領域周辺からブリーチ領域内へのプローブの蛍光の侵入はわずかで

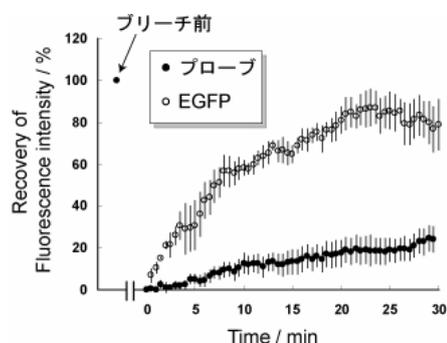


図3 ミトコンドリア内におけるプローブ蛍光の拡散

あった (図3)。一方、mtRNA に結合しない完全長 EGFP をミトコンドリアに局在させ、同様の実験を行った。その結果、EGFP の拡散により 30 分間で 85% の蛍光を取り戻した。これらの結果より、ND6

の mRNA はミトコンドリア内を自然拡散できる状態にはないことが分かった。ND6 の mRNA は、mtDNA やミトコンドリアリボソーム、または膜タンパク質などに結合していると考えられる。

#### [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露下におけるミトコンドリア RNA の動態]

ミトコンドリアは最大の活性酸素種源であり、活性酸素種に暴露された mtRNA は分解されていくことが知られている。そこで、活性酸素種のひとつである H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の暴露下での ND6 の mRNA の動態を、FRAP 法にて観察した。先程の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露無し条件とは異なり、ブリーチ領域は 30 分間で 80% の蛍光を取り戻した (図 4)。これは、ND6 の RNA の分解によって結合していたプローブが遊離し、ブリーチ領域内に拡散していると考えられる。しかしながら、分解された RNA の量を、逆転写 PCR を用いて測定した結果、30 分間に分解された ND6 の mRNA の量はわずか 30% であった。従って、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露によるプローブの拡散は、ND6 の RNA の分解に起因するだけでなく、自然拡散できないはずの ND6 の RNA 自体が、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露によって拡散していくことが考えられる。

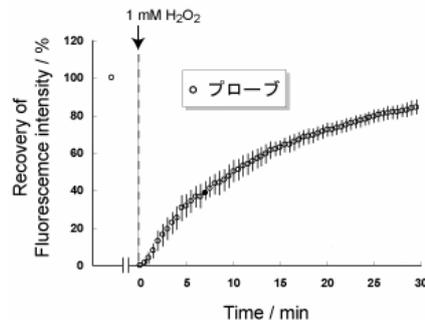


図4 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露によるプローブ蛍光の拡散

#### [まとめ]

本研究では、生細胞内において塩基配列特異的にミトコンドリア内の mRNA を蛍光検出するプローブを初めて開発した。開発したプローブを用いて、ミトコンドリア内の mRNA が自由に拡散できない状態にあることを明らかにした。さらに、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露によって、mRNA の分解と共に、mRNA 自体がマトリックス空間へ拡散していることを明らかにした。

### 【研究 2】 Smac のミトコンドリア膜間腔 (IMS) 局在化配列の同定と膜間腔局在化配列の実用化

#### [背景]

タンパク質を IMS に局在させることができる IMS 局在化アミノ酸配列は同定されていない。また、IMS 局在化アミノ酸配列を簡便に同定する方法は確立していない。従って、IMS 局在化配列を用いて、目的タンパク質を IMS に局在させることは今まで不可能であった。本研究では、IMS に局在するタンパク質を検出する方法を開発し、IMS 局在タンパク質である Smac の IMS 局在化配列を同定する研究を行った。

#### [原理]

目的タンパク質が IMS に局在した時にだけ細胞が蛍光性となる、IMS 局在タンパク質検出法を開発した (図 5)。二つに分割した EGFP の C 末側に、スプライシングタンパク質と完全長の Smac を付加することで IMS に局在させる。次に、N 末側 EGFP とスプライシングタンパク質に局在を確かめたいタンパク質を連結する。この N 末側 EGFP が IMS に輸送された時のみ、プロテインスプライシング反応が進行し、完全長の EGFP が組み継がれ、細胞が蛍光性になる。

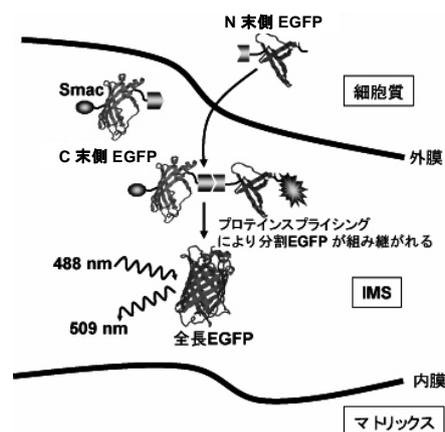


図5 IMS 局在タンパク質の検出原理

### [Smac の IMS 局在化配列の同定]

アミノ酸配列に変異を加えた Smac を用意し、スプライシングタンパク質と N 末側 EGFP に連結した。このプローブを細胞に発現させ、フローサイトメーターで細胞の蛍光強度測定を行った。その結果、239 アミノ酸から成る Smac の、44 番目から 57 番目に存在する疎水性アミノ酸の一部が変異した場合に、IMS への局在が阻害されることが分かった。そこで、Smac の C 末側を削った 1-44 番目から 1-57 番目のアミノ酸配列の局在場所を確かめた (図 6)。その結果、Smac が IMS に局在するためには、1-56 番目までのアミノ酸配列が必要であり、これ以上 C 末側を削るとマトリックスに局在することが判明した。しかし、57 番目に配置されるアミノ酸の種類によって IMS 局在ではなくなる可能性があるため、1-57 番目までを IMS 局在化配列と判定した。次に IMS 局在化配列の N 末側を削り、局在場所を確かめた (図 7)。その結果、11-57 番目の配列は、IMS どころかミトコンドリア自体に輸送されなくなることが分かった。従って、Smac の 1-10 番目のアミノ酸はミトコンドリアへの輸送配列として機能しており、11-57 番目はミトコンドリア内部での IMS への局在化配列として機能していることが分かった。

### [IMS 局在化配列の実用化]

Smac の 1-57 番目までのアミノ酸配列に、pH 感受性のあるタンパク質をつなげた pH センサータンパク質を培養細胞に発現させた。pH センサータンパク質の局在場所を、細胞分画法を用いて検証した結果、IMS に局在していることが分った。pH を測定すると、IMS の pH は 7.5 であることが判明した。

### [まとめ]

本研究では、新規に開発した IMS 局在タンパク質蛍光検出法を用いて、Smac の IMS 局在化アミノ酸配列を詳細に同定できたとともに、同定した IMS 局在化配列を用いて機能性タンパク質を IMS に局在させることを可能にした。

### [総括]

第一の研究では、従来法では困難であった、生きた細胞内での塩基配列特異的な mtRNA の可視化検出法を開発した。新規検出法を用いて解析を行った結果、mtRNA がミトコンドリア内を自由に拡散できない状態におかれていることが判明した。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 暴露下においては、mtRNA がミトコンドリア内を拡散していく様子が観察できた。第二の研究では、IMS に局在したタンパク質の蛍光検出を可能にした。IMS 局在タンパク質である Smac の最短 IMS 局在化アミノ酸配列を正確に同定し、その IMS 局在化配列を用いることで、機能性タンパク質を IMS に局在させることに成功した。

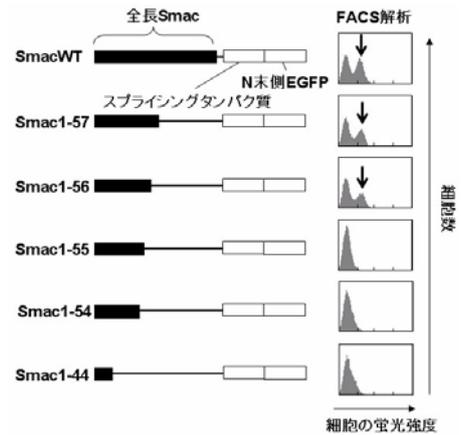


図6 Smac の IMS 局在化配列の同定

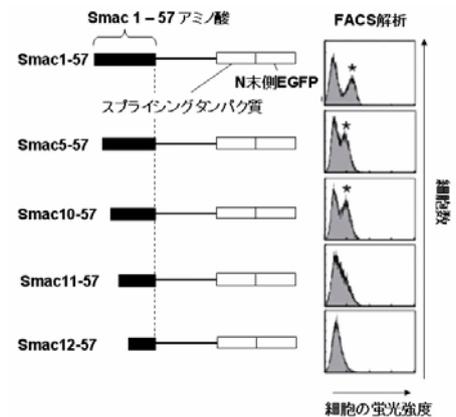


図7 Smac のミトコンドリア輸送配列の同定