

論文審査の結果の要旨

氏名 名取 穰

本論文は以下の4章より成る。

第1章は序論であり、本研究の背景、動機と目的が簡潔述べられている。

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。本研究の1つ目として、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。

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。2つ目の研究として、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。

第2章は、mtRNA 検出プローブを開発し、生細胞内の mtRNA を可視化する試みについて述べている。これは、生細胞内の mtRNA の局在場所や時間変化などの時間空間情報を損なわずに mtRNA の動態観察を可能にすることである。

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) を付加した。mPUM1 と mPUM2 は特定の塩基配列に選択的に結合できるために、両方のプローブが標的 RNA に結合した場合に、RNA-プローブ三元錯体を形成する。三元錯体形成による両プローブの近接により、分割された EGFP どうしがコンプリメンテーションを起こすことで蛍光が回復する。検出対象として、mtRNA のひとつである NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6) のメッセンジャーRNA (mRNA) を選択した。ND6 の塩基配列特異的な検出を行うために、プローブの RNA 結合ドメインに改変を加えた。また、プローブにミトコンドリア局在化配列を付加した。これにより ND6 の mtRNA をプローブが正確に認識検出しているか検証した。次にフローサイトメーターFACS を用いた細胞の蛍光強度測定と fluorescence recovery after photobleach (FRAP) 法を用いて、mtRNA の局在場所を特定している。mtDNA で合成された ND6 の mRNA は、合成後にミトコンドリア全体に分散していくと結論している。またプローブは ND6 の mRNA に強く結合した状態にあり、さらに ND6 の mRNA 自体がミトコンドリア内を自然拡散できる状態にはないことを明らかにしている。更に、自然拡散できないはずの

ND6 の RNA 自体が、 H_2O_2 暴露によって拡散していくことを結論している。以上、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。

第3章では、IMS に局在してい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 局在化配列の同定を目的とした。

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検出法を開発した。二つに分割した EGFP の C 末側とスプライシングタンパク質に、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の融合タンパク質が IMS に輸送された時にのみ、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。アミノ酸配列に突然変異を加えた Smac に、スプライシングタンパク質と N 末側 EGFP を付加したプローブを作製し、FACS にて細胞の蛍光強度解析を行っている。その結果、239 アミノ酸から成る Smac の、44 番目から 57 番目にある疎水性アミノ酸の一部が親水性アミノ酸に置換された場合に、IMS への局在が阻害され、ミトコンドリアのマトリックスに局在してしまうことを明らかにしている。その結果に基づいて、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。その結果、IMS に局在するためには 1-56 番目までの Smac のアミノ酸配列が必要であり、これより短くす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局在場所が変化してくる可能性がめるため、1-57 番目までを正式な IMS 局在化配列と判定した。次に、Smac の 1-57 番目から 12-57 番目のアミノ酸配列の局在場所を確かめた。その結果、11-57 番目の配列では、IMS どころかミトコンドリア自体に輸送されることが分かった。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の IMS 局在化配列として機能していることが分かった。

以上のように、本研究では、生細胞内での塩基配列特異的な mtRNA の可視化検出と、IMS に局在したタンパク質の蛍光検出を可能にした。また 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た。

これらの研究は理学の発展に大きく寄与する成果であり、博士（理学）取得を目的とする研究として充分であると審査員一同が認めた。なお、本論文は各章の研究が複数の研究者との共同研究であるが、論文提出者が主体となって行ったものであり、論文提出者の寄与は充分であると判断する。

従って、博士（理学）の学位を授与できると認める。