

博士論文要旨

線虫ミトコンドリアタンパク質合成系に関する研究

指導教員 北 潔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成17年4月入学

博士後期過程
国際保健学専攻

氏名 末松 卓真

(背景と目的)

生物の遺伝情報を有用な機能分子として変換する細胞内のタンパク質合成の過程は開始、伸長、終止過程の3段階に分けられる。中でも主要な過程である伸長反応では、アミノ酸を 3'末端に付加した tRNA (アミノアシル tRNA) が、mRNA 上の遺伝暗号(コドン)に従ってペプチド鎖合成反応の場であるリボソームへ運ばれる。この機構は原核生物から高等生物に至るまで高度に保存されていると考えられてきた。特に原核生物と、真核生物の細胞小器官の一つであるミトコンドリア内のタンパク質合成系を構成する因子は基本的には同じであり、翻訳伸長因子 EF-Tu がアミノアシル tRNA をリボソームへと運び、EF-G がリボソームの translocation を司る。ところが、動物ミトコンドリアのタンパク質合成系では、保存構造や塩基を一部失って変形した tRNA や、原核生物に比べ縮小化した RNA と肥大化したタンパク質から構成されるリボソーム、またミトコンドリアのみで見出されている EF-G の 2 種類の isoform など、種々の独特な性質を有することが発見されてきた。その中でもとりわけ独特な性質を有すると考えられているのが線形動物ミトコンドリアである。例えば、立体構造上また機能上必須とされていた T arm を欠失した tRNA (20 種)と、D arm を欠失し、かつ T arm の短縮化した tRNA^{Ser} (2 種) という 2 種の異常構造を持つ tRNA のみが存在し、それぞれに対応する特異的な 2 種の EF-Tu が存在する、また、哺乳類ミトコンドリアリボソームと比較しても、リボソーム RNA が更に縮小し、リボソームタンパク質の含有率がさらに増加している、という例が挙げられる。このように、線形動物ミトコンドリアのタンパク質合成系の構成因子は、原核生物や哺乳類ミトコ

ンドリアの因子と比較して、アミノ酸配列や RNA 配列、または立体構造、更に、含まれる因子の種類に関しても非常に独特な性質を有するものを含んでいることから、タンパク質合成系自体も他と比べ特異的な性質を有すると想像できる。しかし、哺乳類ミトコンドリアについては研究が進められているものの、線形動物も含め、無脊椎動物のミトコンドリアタンパク質合成系に関する研究は未だ少ない。

そこで本研究では、線形動物ミトコンドリアタンパク質合成系の独自性を明らかにするとともに、我々哺乳類の系との相違点を見出すために、自由生活性線虫 *Caenorhabditis elegans* を対象に、タンパク質合成に必須の段階である、ポリペプチド鎖伸長反応サイクルの詳細な解明を目的としている。また、本研究の成果を通じて、近縁種である寄生性線形動物のミトコンドリアタンパク質合成系の独自性をターゲットとした抗寄生虫薬剤の発見に繋がることも期待している。

本研究では、線形動物ミトコンドリアの翻訳因子の中で詳細な解析の進んでいない EF-G 及びリボソームについて、精製及び解析を試みた。EF-G に関しては、他生物種の EF-G 及びヒトミトコンドリア EF-G1/EF-G2 の配列を元にした相同性検索より、*C. elegans* ミトコンドリア EF-G1/EF-G2 候補遺伝子として同定された cDNA を利用し、これらの相同タンパク質の大腸菌発現系による大量精製を試みた。リボソームについては、ミトコンドリアリボソームタンパク質にペプチドタグを付加した組換え体を発現する形質転換線虫より、そのペプチドタグを用いてミトコンドリアリボソームの精製を試みた。また、これと平行して、ショ糖密度勾配遠心によるミトコンドリアリボソーム精製法を改善するため、更に純度の高いミトコンドリア精製法の検討を行った。

(結果)

1. *C. elegans* ミトコンドリア翻訳伸長因子 EF-G1 及び EF-G2 の大量発現系の確立

大腸菌発現系を用いて EF-G1 及び EF-G2 の組換え体の大量調製を試みた。EF-G1 については、Novagen 社の pET52b(+) を元に構築した発現ベクターにより、BL21(DE3)codon-plus(RIL)株を形質転換し、可溶性タンパク質として組換え体を発現させることに成功した。一方、EF-G2 は、大腸菌シャペロンタンパク質の一つであるトリガーファクター(TF)を、可溶化タグとして利用しているタカラバイオ株式会社の pCold-TF を元に構築した発現ベクターにより、BL21(DE3)codon-plus(RIL)株及び Rosetta(DE3)株を形質転換し、組換え体の発現を試みたところ、両者の株から TF との融合タンパク質という形ではあるが可溶性タンパク質として得ることができた。

EF-G1 は、6×His-tag を利用してアフィニティー精製を行った後、陰イオン交換クロマトグラフィーにより更に精製することで、95%以上の純度を持つ精製標品を得ることができた。得られた精製タンパク質について、ポリウリジル酸鎖を mRNA とした *E. coli* リボソームによるポリフェニルアラニン鎖合成能を測定し、translocation 活性を保持していることを確認した。また、原核生物型のタンパク質合成系で、リボソーム及び GDP 型 EF-G と安定な三者複合体を形成することでタンパク質伸長反応を阻害する薬剤であるフシジン酸に対して、EF-G1 の感受性の有無を調べたところ、*E. coli* EF-G では完全にタンパク質合成が停止する 0.5 mM という濃度においても、EF-G1 では合成能が 50%程度残存していた。この結果より、*C. elegans* ミトコンドリア EF-G1 はフシジン酸に対し抵抗性を有する

ことが示された。

2. ペプチドタグ付き組換えミトコンドリアリボソームタンパク質を用いた *C. elegans* ミトコンドリアリボソームのアフィニティー精製の確立に向けて

本研究では、リボソームの構成因子であるリボソームタンパク質にペプチドタグを付加した組換え体を *C. elegans* 内で発現させ、リボソームに取り込ませることにより、このペプチドタグを利用して、リボソームをアフィニティー精製する方法を試みた。5種類のミトコンドリアリボソームタンパク質候補遺伝子を選定し、それらについてC末端側に4種類のペプチドタグを融合した発現ベクターを作製し、*C. elegans* への導入を試みた。そのうち、小サブユニットの MRP4 タンパク質の相同タンパク質に S-tag 及び 6×His-tag の並列タグを融合した組換え体について、*C. elegans* 内での発現を確認できた。そこで、この形質転換体から、ミトコンドリアを粗精製して、ミトコンドリアリボソームを粗精製したところ、この組換えタンパク質はミトコンドリアで発現し、粗ミトコンドリアリボソーム画分中にも含まれていることが確認できた。

このタグ付きタンパク質を利用して、アフィニティー精製を試みたが、現時点では、S-tag、6×His-tag のいずれのペプチドタグを利用しても、特異的に十分量のタグ付きタンパク質を担体に吸着させることはできなかった。また、非特異的に担体に吸着するタンパク質が非常に多い、という問題点も挙がった。

細胞質リボソームの混入を最小限に抑えるための、ミトコンドリア調製法の改善策として、Percoll の密度勾配遠心による精製を試みた。その結果、Percoll 濃度が 40%、20% 及び 10% の不連続な密度勾配を利用し、かつ α -amylase を添加することで、20%と 40%の界面に濃縮され、かつ細胞質リボソームの混入が比較的抑えられたミトコンドリアを得ることができた。

(考察)

EF-G について、EF-G1 は活性を保持した組換えタンパク質の精製に成功し、機能解析に踏み出すことができた。本研究で、*C. elegans* ミトコンドリア EF-G1 は哺乳類ミトコンドリア EF-G1 と同様に、*E. coli* リボソーム上で機能でき、またフシジン酸に対して抵抗性を有することが示された。この性質は、哺乳類ミトコンドリア EF-G1 でも見られる性質であり、*C. elegans* と哺乳類のミトコンドリア EF-G1 について *E. coli* リボソーム上での機能的性質が類似していることが示唆された。

EF-G2 は、TF と融合した状態ではあるが、可溶性タンパク質として発現させることに成功した。現在、TF を除去する条件検討を行っているが、TF と EF-G2 の相互作用が強固であるためか、現段階では困難であり、界面活性剤や塩濃度などの更なる条件検討が必要になる。

今後、EF-G1 についてはミトコンドリアリボソーム上での機能解析から、*C. elegans* と哺乳類との相違点を検討していきたい。EF-G2 については、活性を保持したタンパク質としての精製を試み、EF-G1 との機能的相違点を探りたいと考えている。

リボソームに関しては、本研究で発現株の構築に成功した MRP4 ホモログタンパク質が、ミトコンドリア内で発現し、粗ミトコンドリアリボソーム画分に含まれていたことから、*C. elegans* において、こ

の MRP4 ホモログがミトコンドリアリボソームタンパク質として機能していることが示唆された。また本研究では、タグ付きタンパク質がリボソームに組み込まれるところまでは確立できたので、多細胞生物におけるミトコンドリアリボソームのアフィニティー精製技術の確立の第一歩を踏み出したものと考えている。今後は、アフィニティー担体に対して多種のタンパク質が非特異的に吸着することや、担体へのタグ付きタンパク質の吸着量が少量である、という問題点を解決するため、精製段階の条件検討や、利用するペプチドタグもしくは担体の更なる検討が必要となる。

本研究で検討したミトコンドリア調製法で、従来の手法に比べ細胞質リボソームの混入を比較的抑えることに成功した。完全には除去できてはいないが、この調製法を用いることで、より純度の高いミトコンドリアリボソームの調製が可能になると考えている。またこの調製法を用いることで、アフィニティー精製で問題になっていた、非特異的なタンパク質の吸着も抑えられることができるのではないか、と考えている。