

論文内容の要旨

論文題目：哺乳類ミトコンドリア翻訳因子の翻訳後修飾に関する研究

氏名：石澤敏洋

ミトコンドリア(mt)は、全ての真核生物に存在するオルガネラであり、エネルギー生産の他に細胞の分化やアポトーシスの制御にも関与している。ミトコンドリアは核とは別に独自のゲノムDNAをもっており、細胞質とは異なる独自のゲノム、独自の蛋白質合成系を有している。ミトコンドリアの蛋白質合成系は様々なシグナルに応答して制御を受けていると考えられるが、その詳細な機構は分かっていない。本研究では、1) 翻訳伸長因子Tu(EF-Tu_{mt})のリン酸化、2) 翻訳終結因子1L(HMRF1L)のメチル化について解析を行い、翻訳因子の翻訳後修飾とミトコンドリアタンパク質合成系の制御機構および、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。

【1、訳伸長因子Tu (EF-Tu) のリン酸化】

I、背景

EF-Tuは、aa-tRNAをリボソームのAサイトへ運ぶという蛋白質合成系で中心的な働きを担っている。原核生物および真核生物細胞質のEF-Tuは、リン酸化を受けることでその活性がそれぞれ正と負に制御されていることが報告されている。ミトコンドリア蛋白質の網羅的解析により、ミトコンドリア翻訳伸長因子(EF-Tu_{mt})もリン酸化を受けていることが明らかとなったが、そのリン酸化酵素、リン酸化部位、生理的意義についてはまだ不明なままであるため、これらを明らかにすることにした。

II、方法および結果

はじめに、ヒト培養細胞内でEF-Tumtがリン酸化を受けていることを確認する為、培養細胞のラベルを行った。 $H_3^{32}PO_4$ を含む培地中293T細胞を2時間培養し、ミトコンドリアを精製した後、二次元電気泳動で分離した。オートラジオグラフィーおよびウエスタン解析を行った結果、EF-Tumtと一致するスポットで ^{32}P の取り込みが確認でき、リン酸化を受けることで酸性側へシフトすることが示唆された(図1)。

次に、EF-Tumtのリン酸化酵素を同定を試みた。大腸菌で発現させたEF-Tumt、細胞抽出液、 $\gamma\text{-}^{32}P\text{-ATP}$ を用いて*in vitro*でEF-Tumtをリン酸化する系を確立し、この活性を指標にして細胞抽出液よりEF-Tumtリン酸化酵素を精製した。細胞は、最も強い活性が検出されたTPA処理後のHL-60細胞を利用した。MS分析の結果、この酵素はprotein kinase C delta (PKC δ)であることが明らかとなった。組換えPKC δ がEF-Tumtをリン酸化できること、PKC δ 特異的な阻害剤であるRottlerinでEF-Tumtリン酸化酵素活性を阻害できることを確認している(図2)。さらに、PKC δ と、EF-Tumtの細胞内における局在についても解析した。Proteinase K protection assayおよびミトコンドリアの膜分画の結果から、HL-60細胞においてPKC δ はTPA処理に応じてミトコンドリアへ局在しており、一部は内膜やマトリックスに存在していること、マトリックス蛋白質であると考えられてきたEF-Tumtは主に内膜に局在していることなどが明らかとなった。この結果から、PKC δ は内膜またはマトリックスでEF-Tumtと共存しており、これらの場所でリン酸化していることが示唆された(図3)。

最近、EF-Tumtのリン酸化が心筋の虚血再灌流に伴って促進されること、心筋の虚血再灌流に伴ってPKC δ がミトコンドリアに移行することが2つのグループから独立に報告されたが、これらもPKC δ がEF-Tumtのリン酸化酵素であることを支持している。図1および、インタクトなミトコンドリアを $\gamma\text{-}^{32}P\text{-ATP}$ でラベルし、二次元電気泳動で分離した結果よりEF-Tumtはリン酸化を受けると酸性側へシフトすることが確認できた。また、HL60RGをTPA処理すると、酸性側のEF-Tumtから分解されていくことから、EF-Tumtはリン酸化を受けることで不安定化され、何らかの経路で分解を受けていることが示唆された。

III、考察および今後の展望

今回、リン酸化を受けたEF-Tumtが不安定化され、何らかの経路で分解を受けていることを示唆する結果が得られた。また、我々はHL-60のTPA処理に伴ってmt蛋白質合成系が抑制される事を見だしており、これらの結果からPKC δ はミトコンドリアでEF-Tumtをリン酸化することによってEF-Tumtレベルを調製し、細胞のアポトーシス感受性を制御しているのではないかと仮説をたてている。既に、PKC δ に対するmiRNAを恒常的に発現する細胞株の作成に成功しており、細胞のラベルを行うことで、PKC δ が細胞内でEF-Tumtをリン酸化しているという直接的な結果が得られると考えている。また、PKC δ ノックダウン細胞と正常な細胞を比較することでPKC δ の有無および、リン酸化の有無とアポトーシスの関連についても解析が可能となる。

PKC δ は、アポトーシス誘導に関与することが知られており、ミトコンドリアへの移行とシトクロムC放出とに相関があること等が報告されてきた。今後は、リン酸化によるEF-Tumtの機能変化、リン酸化とアポトーシス誘導との相関などについて検証し、EF-Tumtリン酸化の生理的意義を明らかにしてゆきたいと考えている。また、EF-Tumtのリン酸化部位については現在解析中であり、同定ができ次第変異体を作製し細胞に導入することでアポトーシスへの感受性の変化などを調べたいと考えている。

【2、翻訳終結因子 (RF1L) のメチル化】

I、背景

翻訳終結因子は終止コドンを認識し、翻訳複合体を新生タンパク質、リボソーム、mRNAに解離させる働きを持つ。これまでヒトミトコンドリア翻訳終結因子の同定は行われておらず、その詳細な機能解析も行われていなかったが、最近当研究室でミトコンドリア蛋白質であるRF1 like protein (HMRF1L) が、ミトコンドリアにおける終止コドン (UAGおよびUAA) の認識を担う翻訳終結因子であることが明らかになった (最近同様の結果が *Mol Cell*. 2007 Sep 7;27(5):745-57.でも報告された)。

大腸菌や酵母等の翻訳終結因子はそのGGQモチーフにおいてメチル化を受けることが報告されているが、その生理的役割については不明な点も多い。新たに同定したHMRF1Lについてメチル化の有無を解析し、メチル化が確認できた場合にはメチル化酵素の同定と、メチル化の生理的な意義を明らかにすることにした。

II、結果

はじめに、ヒトミトコンドリア内でHMRF1Lがメチル化を受けているか解析した。恒常的にHMRF1L-3×FLAGを発現するHeLa細胞株を作製し、これらの細胞からミトコンドリアを単離した後、anti-FLAG M2抗体を用いて免疫沈降を行いHMRF1L-3×FLAGを精製した。単離したHMRF1LについてMS解析を行ったところ、GGQモチーフを含む断片で分子量14のシフトが見られ、メチル化を検出することができた (図3)。また、大腸菌で発現させた組み替えHMRF1Lもメチル化を受けていたことから、大腸菌のメチル化酵素もHMRF1Lを認識することが示唆される。

次に、翻訳終結因子のメチル化酵素を同定することとした。大腸菌ではPrmC/HemKが、酵母ではMtq1p/Mtq2pが翻訳終結因子のメチル化酵素として報告されているため、これらの配列をもとにBLASTサーチを行い、いくつかの候補を得た。さらに、候補の中から細胞内局在を解析するプログラムを用いてミトコンドリアへ局在するものを選び出し、HMPrmCを同定した。免疫染色および細胞分画を行い、HMPrmCが実際にミトコンドリア蛋白質であることを明らかにした (図4)。

III、考察および今後の展望

新たに同定されたHMRF1Lがメチル化を受けていることを明らかにした。また大腸菌PrmCのヒトホモログであるHMPrmCがミトコンドリア蛋白質であることを明らかにした。siRNAを用いてHMPrmCをノックダウンし、HMPrmCの存在量とメチル化の割合について相関を見ることで、RF1Lのメチル化酵素がHMPrmCであることを証明したい。また、in vitro translation systemを用いて、メチル化RF1Lの機能解析を行うことで、ヒトミトコンドリア翻訳終結過程に関する知見をえたい。

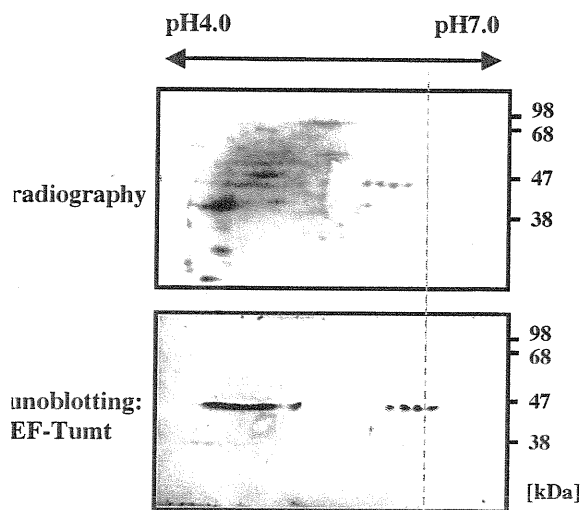


図1 EF-Tumtリン酸化の確認
細胞をラベルした後二次元電気泳動で分離した

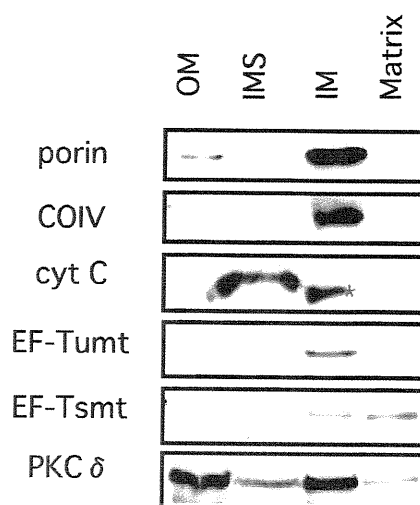


図2 ミトコンドリアの膜分画
TPA処理後48時間のHL60RGから調製
各種抗体でWestern解析を行った

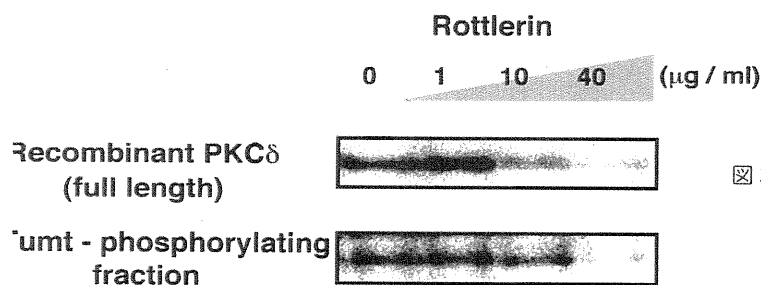


図3 組み替えPKCδによるEF-Tumtのリン酸化
オートラジオグラフィーで検出した

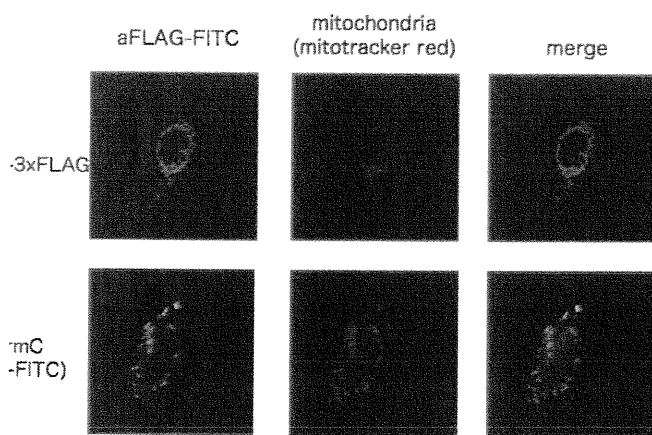


図4 HMRF1L、HMPrmCの細胞内局在
FLAGおよびmycタグを付加して免疫染色を行っ

図5 HMRF1LのMS解析
anti-FLAG抗体で免疫沈降をした後、解析した

