

論文審査の結果の要旨

氏名 石澤 敏洋

本論文は2章からなり、第1章では哺乳類ミトコンドリア翻訳伸長因子 Tu (EF-Tumt) のリン酸化と生理的意義について、第2章では哺乳類ミトコンドリア翻訳終結因子 (HMRF1L) のメチル化と生理的意義について明らかにしている。これら2つの章を通してミトコンドリア翻訳因子の翻訳後修飾がタンパク質合成系に与える影響について述べられている。

第1章では、まず、EF-Tumt のリン酸化酵素の同定を行った。大腸菌で発現させた EF-Tumt、細胞抽出液、 γ -³²P-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。MS 解析の結果、この酵素は protein kinase C delta (PKC δ) であることが明らかとなった。また、①組換え PKC δ が EF-Tumt をリン酸化できること、②PKC δ 特異的な阻害剤を反応系に加えることで EF-Tumt リン酸化酵素活性を阻害できること、③PKC δ をノックダウンすることで EF-Tumt のリン酸化が抑制されることの3点からも EF-Tumt リン酸化酵素が PKC δ であることを確認した。これまで、PKC δ はアポトーシス刺激に応答してミトコンドリアへ移行することが知られてきたが、その役割は不明なままだった。本論文では、それが EF-Tumt のリン酸化であることを明らかにしている。

また、HL-60RG 細胞ではリン酸化を受けることで EF-Tumt が減少すること、一方 293T 細胞ではリン酸化を受けることで安定化されていることを示唆する結果を示し、EF-Tumt がリン酸化によってその安定性を制御されており、EF-Tumt リン酸化がアポトーシスの引き金になっている可能性について述べられている。

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移行し、一部は内膜やマトリックスに存在していることを明らかにした。PKC δ は、膜へ移行することが知られており、アポトーシスに関わるミトコンドリアへの移行も外膜への結合等が考えられてきた。しかし、本論文では、PKC δ がミトコンドリア内部にまで入り込んでいる事を初めて明らかにした。

第2章では、HeLa 細胞から精製した HMRF1L がメチル化を受けている事を、MS 解析により示している。様々な種において、翻訳終結因子は GGQ モチーフでメチル化を受けることが知られている。これまでヒトミトコンドリアの翻訳終結因子に関する研究はなされておらず、本論文が初めてそのメチル化を明らかにした。

また、そのメチル化酵素を同定するため、大腸菌 (PrmC/HemK) および酵母 (Mtq1p/Mtq2p) の配列をもとに BLAST search を、またミトコンドリアへの局在を調べるために target P を用いることで、新たに HMPrmC を同定した。免疫染色および細

胞分画を行い、HMP_{PrmC} が実際にミトコンドリアへ局在していることを確認し、同時に HMR_{F1L} とミトコンドリア内で共局在していることを示した。さらに、siRNA を用いて HMP_{PrmC} をノックダウンすることにより、HMR_{F1L} のメチル化が抑制されることも確認している。HMP_{PrmC} ノックダウン株と通常株を用いたミトコンドリアタンパク質のプルダウン実験より、ストレス条件下では HMP_{PrmC} のノックダウン（つまり HMR_{F1L} のメチル化の減少）によりミトコンドリアタンパク質合成系の活性が低下していることを明らかにした。これらの結果は、大腸菌や酵母を用いた先行研究と一致する結果であり、ヒトミトコンドリアでも翻訳終結因子の活性化には GGQ モチーフでのメチル化が重要であることが示された。

本論文は、ヒトミトコンドリア翻訳因子の翻訳後修飾について詳細に解析を行った初めての論文であり、リン酸化酵素とメチル化酵素を同定したこと、さらに生理的意義についても解析を行うことで、ミトコンドリアタンパク質合成系の制御機構について新たな知見を加えたことが評価される。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。