

論文の内容の要旨

論文題目 ヒトミトコンドリアにおける mRNA 代謝の分子メカニズム

氏 名 中 條 岳 志

I. 研究の背景と目的

ミトコンドリアは真核細胞に存在する細胞内小器官であり、細胞の ATP 産生において中心的な役割を担う。真核生物の進化の過程において、ミトコンドリアは好気性細菌が細胞内共生したことに由来するため、ミトコンドリアは核ゲノムとは独立した DNA と遺伝子発現系を有する。ヒトのミトコンドリア DNA (mtDNA)は 16.6 kbp の環状 2 本鎖 DNA であり、H 鎖と L 鎖に合計 37 個の遺伝子をコードしている。内訳としては、13 遺伝子が酸化的リン酸化に関与する必須タンパク質をコードし、これらのタンパク質をミトコンドリア内で翻訳するために用いられる tRNA の遺伝子が 22 種類、rRNA の遺伝子が 2 種類である。mtDNA 上には HSP1、HSP2、LSP の 3 種類のプロモーターが存在する。ミトコンドリア RNA ポリメラーゼの作用により、HSP2 および LSP から、H 鎖および L 鎖のほぼ全長が転写される。この長い前駆体 RNA が tRNA の前後で切断されると、tRNA、rRNA、11 種類の mRNA (ND4L/4、ATP8/6 はバイシストロニック) が生じる。従って、HSP2 プロモーターから転写される H 鎖由来の前駆体 RNA にコードされた 10 種類のミトコンドリア mRNA は、同じコピー数だけ生成されると考えられる。しかしながら、過去の報告からこれらの mRNA のコピー数は異なることが強く示唆されている。さらに当研究室の先行研究より、11 種類のミトコンドリア mRNA の半減期が 68 分から 231 分と広範囲に及ぶことが示されている。従って、ミトコンドリア mRNA の定常状態量は、転写後の代謝過程で調節されていると考えられるが、その分子メカニズムは明らかにされていない。本研究ではヒトミトコンドリア mRNA の代謝の全体像を解明することと、安定性を制御する分子メカニズムを理解することを目的とした。

II. ミトコンドリア mRNA のコピー数の同定

ミトコンドリア mRNA 代謝の全体像を理解するためには、mRNA の正確なコピー数の情報が必要である。ヒト子宮頸ガン由来の HeLa 細胞におけるミトコンドリア mRNA の分子数を絶対定量した。HeLa 細胞由来 total RNA 中の各ミトコンドリア mRNA を定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) により解析し、試験管内転写物を用いて作成した検量線から細胞一個あたりのコピー数を求めた。ミトコンドリア mRNA の分子数は一細胞あたりに 6,000 コピー (ND5 mRNA) から 51,000 コピー (COX2 mRNA) の間に分布し、mRNA 間では最大 8.5 倍の定常状態量の違いが存在した。各ミトコンドリア mRNA のコピー数を、当研究室で過去に測定した各ミトコンドリア mRNA の半減期に対して

ロットした結果、半減期とコピー数の間に明確な相関($R^2=0.601$)が見られた。すなわち、半減期の短い mRNA はコピー数が少なく、半減期の長い mRNA ほどコピー数が多いという傾向がある。これらの結果から、転写後レベルでミトコンドリア mRNA の安定性・分解を制御する機構が存在することが強く示唆された。

III. ミトコンドリア mRNA の安定化装置の解析

次に、ミトコンドリア mRNA が転写後レベルでどのような機構で制御されているかを調べた。先行研究により、LRPPRC/SLIRP 複合体が何らかの方法でミトコンドリア mRNA の成熟または安定化に関与することが示唆されていた。LRPPRC/SLIRP 複合体がミトコンドリア mRNA の転写後の安定性を制御するかを直接的に検証するために、ミトコンドリアの転写を阻害し、qRT-PCR を用いてミトコンドリア mRNA が分解していく様子を観測した。その結果、SLIRP をノックダウンした細胞ではコントロールの細胞に対してミトコンドリア mRNA の分解が加速することが判明した。さらに、LRPPRC または SLIRP をノックダウンした後に各 mRNA の定常状態量を測定した結果、半減期の長いミトコンドリア mRNA ほど定常状態量が顕著に減少した。従って、LRPPRC/SLIRP 複合体が寿命の長いミトコンドリア mRNA の転写後の安定化を担うことが示された。

次に、LRPPRC/SLIRP 複合体がどのようなメカニズムでミトコンドリア mRNA を安定化するのかを探ることにした。ND5 および ND6 以外の 9 種類のミトコンドリア mRNA には、50 塩基ほどのポリ A 鎖、または数塩基長のオリゴ A 鎖がミトコンドリアポリ A 付加酵素 (MTPAP) によって付加される。ポリ A 付加は数種類のミトコンドリア mRNA の安定化に関与することが知られていた。そこで LRPPRC/SLIRP 複合体がミトコンドリア mRNA のポリ A 鎖の代謝に関与することでミトコンドリア mRNA を安定化する可能性を検証した。HeLa 細胞において LRPPRC または SLIRP をノックダウンした際にミトコンドリア mRNA の 3'末端近傍を観察した結果、ポリ A 鎖が短縮する様子が観察された。従って、LRPPRC/SLIRP 複合体がミトコンドリア mRNA の維持に関与することが明らかになった。

LRPPRC と SLIRP はそれぞれ PPR、RRM という RNA 結合ドメインを有するため、LRPPRC/SLIRP 複合体は RNA と結合すると考えられた。LRPPRC/SLIRP 複合体が結合する RNA の詳細な情報を得るために、HeLa 細胞の内在 LRPPRC を免疫沈降し、共沈する RNA の回収率を調べた。その結果、全 11 種類のミトコンドリア mRNA が効率的に LRPPRC/SLIRP 複合体と共沈した。コントロールとして、細胞質 mRNA やミトコンドリア tRNA、ミトコンドリア 16S rRNA は共沈しなかったことから、LRPPRC/SLIRP 複合体はミトコンドリア mRNA に特異的に結合することが示された。また、ミトコンドリア RNA が転写後、どの段階で LRPPRC/SLIRP 複合体が結合するかを調べるために、前駆体 RNA についても解析を行った結果、LRPPRC/SLIRP 複合体は rRNA 前駆体にはほとんど結合しない一方でミトコンドリア mRNA 前駆体には結合していた。この結果より、LRPPRC/SLIRP 複合体は転写直後のミトコンドリア

mRNA に選択的に結合することが示唆された。

続いて、LRPPRC/SLIRP 複合体が mRNA のどの領域に結合しているかを調べるために、LRPPRC/SLIRP 複合体を免疫沈降後、共沈した RNA 断片をクローニングした。得られた 114 クローンのうち 112 クローンがミトコンドリア DNA 上にマッピングされ、そのうち 97 クローンがミトコンドリア DNA のタンパク質遺伝子に帰属された。加えて、結合配列にはポリ A 鎖およびオリゴ A 鎖が含まれず、多様な配列が混在していた。従って、LRPPRC/SLIRP 複合体はミトコンドリア mRNA の翻訳領域に結合しポリ A 鎖には結合しないことが強く示唆された。LRPPRC/SLIRP 複合体が tRNA や rRNA と結合しない理由としては、tRNA と rRNA は転写共役的にフォールディングして高次構造を形成し、様々なタンパク質と特異的に結合するため、一本鎖 RNA を好む LRPPRC/SLIRP 複合体と結合しないことが考えられる。

IV. ミトコンドリア mRNA の分解装置の同定

LRPPRC/SLIRP 複合体によるミトコンドリア mRNA の安定化メカニズムをさらに理解するためには mRNA 分解酵素の実体を特定する必要があるが未解明であった。ミトコンドリア mRNA 分解酵素の候補として 8 種類のタンパク質を選択し、siRNA を用いてノックダウンした結果、PNPase をノックダウンした場合のみにおいて、ミトコンドリア mRNA のプロファイルに顕著な変化が見られた。PNPase が細胞内でミトコンドリア mRNA の分解に関与するかを検証するために、HeLa 細胞において PNPase をノックダウンした後、ミトコンドリアの転写を阻害し、mRNA を定量して mRNA が分解する様子を観測した。その結果、PNPase をノックダウンした細胞では、全 11 種類のミトコンドリア mRNA の分解がほぼ停止していることが判明した。この結果は PNPase がミトコンドリア mRNA の分解に必要であることを示している。先行研究で PNPase が試験管内で 3'エキソヌクレアーゼ活性を有することが示されていることと合わせ、PNPase がヒトのミトコンドリア内で働く主要な mRNA 分解酵素であると結論する。ポリ A 鎖を持たない ND5 mRNA の分解においても PNPase が必要であることから、PNPase は脱アデニル化酵素として機能するのみならず mRNA 本体を分解すると言える。

続いて、ミトコンドリア mRNA の分解に関与することが報告されている SUV3 ヘリケースについても同様の実験を行った。その結果、SUV3 をノックダウンした細胞においても PNPase をノックダウンした細胞と同様に、ミトコンドリア mRNA の分解がほとんど起こらない様子が観測された。この結果は、ATP 依存的なヘリケースである SUV3 と PNPase の両者がセットになってミトコンドリア mRNA を分解していることを意味する。

V. LRPPRC/SLIRP 複合体によるミトコンドリア mRNA のポリ A 付加の促進

上記の III において LRPPRC/SLIRP 複合体がミトコンドリア mRNA のポリ A 鎖の維持に必要であったことから、LRPPRC/SLIRP 複合体がポリ A 付加を促進する可能性

が示唆された。これを検証するために、HeLa 細胞において PNPase をノックダウンすることで脱アデニル化が起こらないようにした上で、SLIRP をノックダウンした。ミトコンドリア mRNA の 3'末端を観察した結果、ポリ A 付加されていない mRNA が蓄積する様子が観察された。この結果は、細胞内で LRPPRC/SLIRP 複合体がポリ A 付加を促進するために必要であることを示唆する。LRPPRC/SLIRP 複合体の存在がポリ A 付加を促進するための十分条件であるかを調べるために、組換え MTPAP および試験管内転写した COX3 mRNA を用いて、試験管内でポリ A 付加反応を行った。その結果、組換え LRPPRC と SLIRP を加えるに従ってポリ A 付加が促進される様子が観察された。この結果から LRPPRC/SLIRP 複合体は MTPAP によるポリ A 付加を促進することが証明された。加えて、試験管内でポリ A 付加の促進は SLIRP ではなく主に LRPPRC が担うことを見出した。細胞内のポリ A 鎖を維持するために SLIRP が必要である理由としては、SLIRP が LRPPRC をタンパク質レベルで安定化することが挙げられる。

LRPPRC がポリ A 付加を促進する機構をより理解するために、前提として MTPAP の基質認識を試験管内で調べた。その結果、MTPAP は 3'末端が一本鎖の RNA を好んで A 付加することを見出した。続いて、一本鎖 RNA と MTPAP を用いた試験管内 A 付加反応を行う際に LRPPRC を加えた結果、ポリ A 付加が顕著に増加した。この結果より RNA が効率的にポリ A 付加されるためには RNA が一本鎖であることのみならず、LRPPRC の存在が必要であることが判明した。一方で、ミトコンドリア mRNA が単独では複雑な二次構造を形成することから、LRPPRC が mRNA の二次構造をほぐして A 付加を促進する可能性も考えられた。この可能性を検証するために、MTPAP による A 付加を受けにくいヘアピン状の RNA を作製し、ここに LRPPRC を加えた結果、ポリ A 付加が顕著に増加する様子を観察した。この結果より、LRPPRC がミトコンドリア mRNA の二次構造をほぐして MTPAP によるポリ A 付加を促進することが強く示唆された。

VI. 結論

本研究では、初めにヒト細胞中のミトコンドリア mRNA のコピー数を同定した結果、ミトコンドリア mRNA 量が転写後レベルで制御されていることを明確に示した。続いて、ミトコンドリア mRNA の転写後制御機構を調べた結果、LRPPRC/SLIRP 複合体がミトコンドリア mRNA を安定化する主要な因子であること、および 3'エキソヌクレアーゼ PNPase がミトコンドリア mRNA を分解する主要な酵素であることを見出した。LRPPRC/SLIRP 複合体が転写直後の mRNA の翻訳領域に結合し、PNPase と SUV3 ヘリケースによる 3'末端からの分解を抑制し、MTPAP によるポリ A 付加を促進することを見出した。以上を総じて、本研究はヒトミトコンドリア mRNA 代謝の全体像と分子メカニズムの理解を深めることに大きく貢献し、ミトコンドリア研究を前進させたものであると結論する。