

論文の内容の要旨

論文題目 哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成における G タンパク質の機能解析

氏 名 小谷 哲也

1. 背景・目的

ミトコンドリアには、核 DNA とは異なる独自の DNA (mtDNA) がある。その mtDNA にコードされた 13 個の蛋白質を翻訳するため、ミトコンドリアには独自の蛋白質合成系が存在し、独自のリボソームがある。哺乳類ミトコンドリアリボソームの沈降係数は 55S であり、39S 大サブユニットと 28S 小サブユニットで構成される。核 DNA にコードされたリボソーム蛋白質と mtDNA にコードされたリボソーム RNA (rRNA) が組み合わさってミトコンドリアリボソームは形成されるが、その生合成機構については、アセンブリーの機序をはじめとして細胞周期とどのように連動しているかなど、あまり理解されていない。近年、ミトコンドリアリボソーム蛋白質の変異によるパーキンソン病などの神経変性疾患の発症が報告されており、その中にはミトコンドリアリボソームの生合成に異常があると示唆されているものがある。そのような疾患の発症機構を理解するには哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成機構の解明が必要である。

リボソームの生合成では rRNA のプロセシングや修飾とリボソーム蛋白質の組み込みが協調的に行われている。これらの過程は helicase や修飾酵素、GTPase などの様々な生合成因子によって制御されている。本研究ではヒトの G タンパク質である ObgH1 と Mtg1 に注目した。ObgH1 は Obg family に属しており、バクテリアの Obg はリボソームの後期のアセンブリーに関与することが示唆されている。また、ObgH1 はミトコンドリアに局在し、大腸菌の Obg 欠損を相補できることが報告されている。Mtg1 は YlqF/YawG family に属しており、バクテリアの YlqF はリボソームの後期のアセンブリーに関与することが示唆されている。酵母 Mtg1 は、ミトコンドリアに局在しており、欠損によりミトコンドリアの翻訳異常やミトコンドリアの rRNA の分解が見られていることから、ミトコンドリアリボソームの生合成に関与することが示唆されている。ヒト Mtg1 については、ミトコンドリアに局在することや酵母 Mtg1 の機能を相補することが報告されている。本研究では ObgH1 とヒト Mtg1

の機能について解析を進め、哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成機構についての知見を得る事とした。

2. 実験結果

ObgH1、Mtg1 のミトコンドリアでの局在

これまでの免疫染色法による局在解析により、ObgH1 と Mtg1 はミトコンドリアに局在することがわかっている。そこで、ObgH1、Mtg1 がミトコンドリアのどの部分に局在するのかを調べた。ミトコンドリアを外膜、膜間、内膜、マトリクスに分画し、Western blotting で ObgH1 と Mtg1 を検出すると、ObgH1 と Mtg1 はミトコンドリアの内膜に局在することが分かった。

ObgH1、Mtg1 とミトコンドリアリボソームの相互作用

ObgH1、Mtg1 が属する Obg family、YlqF/YawG family の蛋白質は GTP 依存的にリボソームの大サブユニットと相互作用することが知られている。そこで、ObgH1、Mtg1 がミトコンドリアのリボソームと相互作用するかを解析した。精製した 55S リボソームと精製した ObgH1、Mtg1 を様々な種類の GNP 存在下で混合し、ショ糖密度勾配(SDG)により分離した。その結果、図 1 に示すように ObgH1、Mtg1 が 39S 大サブユニットと相互作用し、55S リボソームとは相互作用しないことが分かった。ObgH1 は GTP や GTP の非加水分解アナログである GDPNP 存在下で 39S 大サブユニットと相互作用していた。それに対し、Mtg1 は GDPNP 存在下でのみ 39S 大サブユニットと相互作用していた。さらに、培養細胞から調製したミトコンドリアの抽出液においても ObgH1、Mtg1 は 39S 大サブユニットと相互作用することが分かった。

Mtg1 と 39S 大サブユニットが結合することがわかったので、Mtg1 の大サブユニット上での結合部位に関する知見を得るために、クロスリンクを行った。精製した 39S 大サブユニットと His-tag 付 Mtg1 を GDPNP 存在下で混ぜ、sulfo-MBS を用いてクロスリンクした。サンプルを超速心することで free の Mtg1 を除き、SDS により Mtg1 結合 39S 大サブユニットをバラバラにした後、Ni 精製することで Mtg1 とクロスリンクしたものを回収した。LC-MS/MS によりクロスリンクした蛋白質を同定した結果、Mtg1 は C10orf46 とクロスリンクすることが分かった。

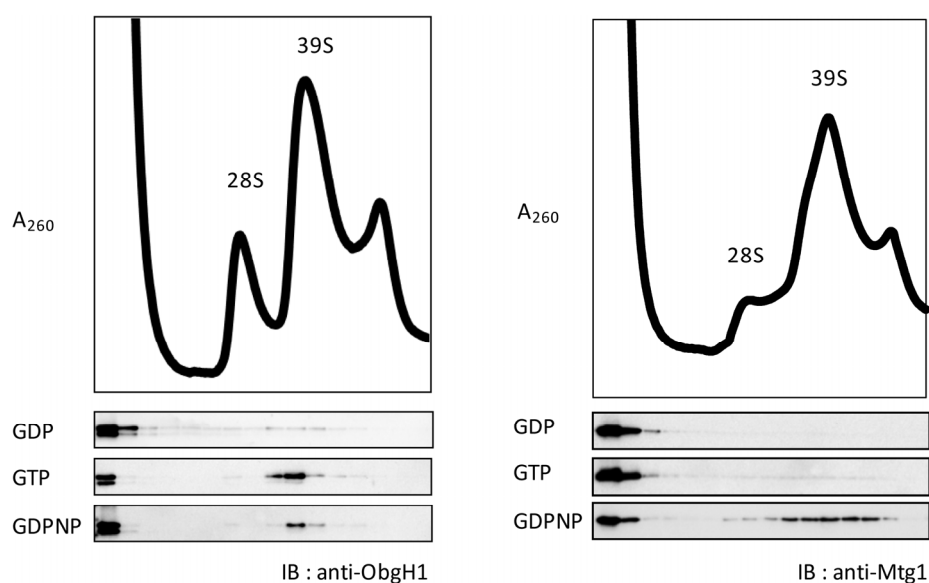


図 1 ObgH1、Mtg1 とミトコンドリアリボソームの相互作用

ObgH1、Mtg1 のノックダウンの影響の解析

ObgH1、Mtg1 を RNAi により一過的にノックダウンした時の細胞に与える影響を調べた。まず、ミトコンドリアの rRNA について解析した。RNAi 処理した細胞から total RNA を抽出し、Northern blotting によりミトコンドリアの rRNA について解析した。その結果、ObgH1、Mtg1 をノックダウンしてもミトコンドリアの rRNA の量に変化は見られず、また、前駆体の蓄積も観察されなかった。このことは Obg family、YlqF/YawG family 蛋白質が rRNA のプロセシングに関与することと対照的であった。

次にパルスラベル法によりミトコンドリアでの翻訳活性を調べた。ObgH1 をノックダウンするとミトコンドリアでの翻訳パターンが変化することがわかった (図 2)。ほとんどの蛋白質合成は大きな変化がないのに対し、ATP6 と ATP8 の合成量が上昇していた。それに対し、Mtg1 をノックダウンすると、ミトコンドリアの翻訳活性が全体的に低下することが分かった (図 2)。

さらに呼吸鎖複合体への影響を調べた。まず呼吸鎖複合体のサブユニットの定常レベルについて解析した。ObgH1 をノックダウンしてもそれほど大きな変化は見られなかった。それに対し、Mtg1 をノックダウンすると、核 DNA にコードされたサブユニットは変化がなかったが、mtDNA にコードされたサブユニットの量は減少していた。次に呼吸鎖複合体のアセンブリーについて Blue Native PAGE により解析した (図 3)。Mtg1 をノックダウンすると、Complex I と IV の量が減り、それに伴って Complex I, III, IV で形成される supercomplex の量も減少していた。さらに、Complex V についてもアセンブリーに欠陥が生じ、異常な複合体の蓄積が見られた。ObgH1 をノックダウンすると Complex V のアセンブリーのみが異常となり、異常な複合体が蓄積した。このことは ObgH1 をノックダウンした時に、Complex V のサブユニットである ATP6 と ATP8 の翻訳量が上昇していることと関係していると考えられる。核 DNA にコードされた蛋白質のみで形成される Complex II に関しては ObgH1 や Mtg1 をノックダウンしても変化はなかった。

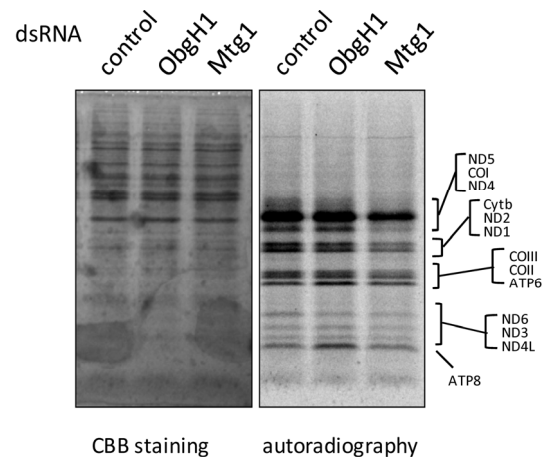


図 2 ミトコンドリアの翻訳活性

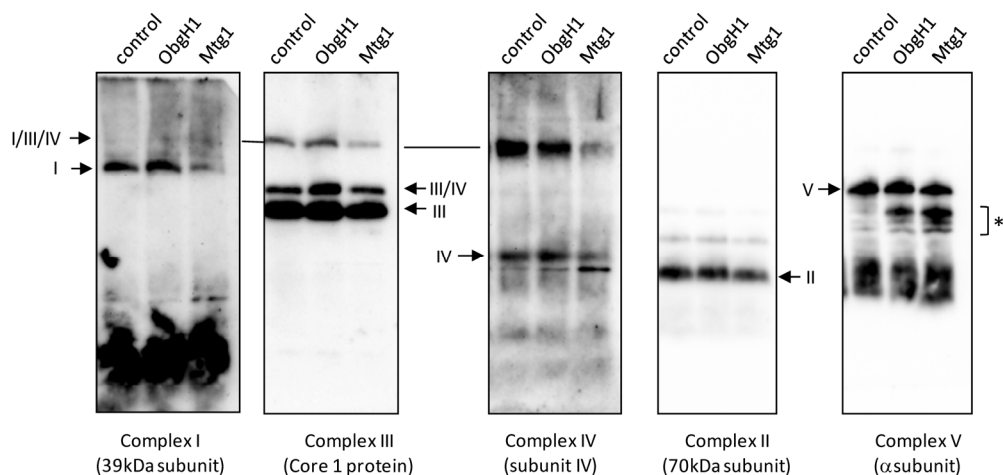


図 3 ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 (Blue Native PAGE)

ObgH1、Mtg1 の GTPase 活性

Obg 蛋白質は低い内因性の GTPase 活性を有していることが報告されている。また、YlqF/YawG 蛋白質はリボソーム依存的な GTPase 活性も持っていることが知られている。そこで、ObgH1 と Mtg1 の GTPase 活性について解析を行った。ObgH1 についてはこれまでの報告と同様に内因性の GTPase 活性を有することがわかった。それに対して、Mtg1 は内因性の GTPase 活性は有していなかったが、39S 大サブユニットもしくは 55S リボソーム依存的な GTPase 活性を持つことがわかった ($k_{cat} = 0.031 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$) (図 4)。また、ObgH1 のリボソーム依存的な GTPase 活性は検出されなかった。

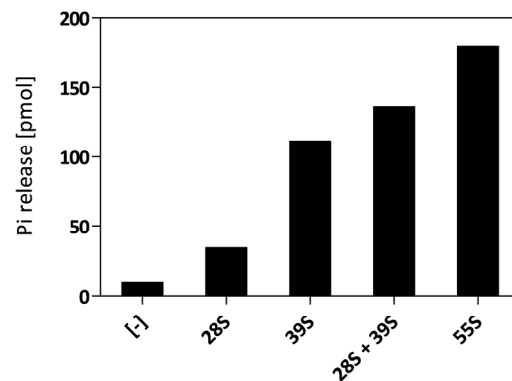


図 4 Mtg1 の GTPase 活性

3. まとめと考察

本研究により ObgH1 と Mtg1 は 39S 大サブユニットに結合し、ミトコンドリアの翻訳活性や呼吸鎖複合体のアセンブリーに関わっていることがわかった。

Mtg1 は 39S 大サブユニットにより GTPase が活性化される。さらに、39S 大サブユニットとの結合は GDPNP の存在下のみ検出可能で、GTP や GDP 存在下では検出できなかった。このことから Mtg1 は 39S 上で GTP を加水分解すると 39S から解離すると考えられる。このことはバクテリアの YlqF でも見られ、Mtg1 は YlqF と同様に大サブユニットの生合成に関与していると考えられる。Mtg1 をノックダウンしたときに見られるミトコンドリアの翻訳活性の全体的な低下は、Mtg1 をノックダウンすることでリボソームの生合成が異常になり、成熟したリボソームが減少しているためだと考えられる。

ObgH1 は GTP や GDPNP 存在下で 39S 大サブユニットと結合していた。また、リボソーム依存的な GTPase 活性は検出できなかった。ObgH1 も Mtg1 と同様に GTP 結合型でリボソームに結合し、GTP の加水分解を伴ってリボソームから解離すると考えられるが、そのメカニズムは分かっていない。他の因子が ObgH1 の解離に関わってくる可能性も考えられ、さらなる解析が必要である。ObgH1 をノックダウンすると、呼吸鎖複合体の Complex V のサブユニットである ATP6 や ATP8 の翻訳活性が上昇する。さらに、Complex V のアセンブリーにも影響が生じ、異常な複合体が蓄積する。このことから、ObgH1 がミトコンドリアの翻訳や呼吸鎖複合体のアセンブリーに関与していることはわかった。しかし、ObgH1 の詳細な役割に関してはさらなる解析が必要である。

Mtg1 とクロスリンクした C10orf46 は細胞周期にかかわっている因子として知られており、核や細胞質に局在すると言われている。これまでに C10orf46 がミトコンドリアに局在して機能するという報告はなく、C10orf46 がミトコンドリアに局在し、さらにはリボソームと関係のある因子であるかさらなる解析が必要である。