



Title	酵母のATPaseインヒビター蛋白前駆体のミトコンドリアへの移行およびそのextraペプチドの部分一次構造
Author(s)	吉田, 征夫
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33704
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	よし 吉	だ 田	ゆく 征	お 夫		
学位の種類	医	学	博	士		
学位記番号	第	6	1	4	5	号
学位授与の日付	昭和 58 年 6 月 29 日					
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当					
学位論文題目	酵母のATPase インヒビター蛋白前駆体のミトコンドリアへの移行およびそのextra ペプチドの部分一次構造					
論文審査委員	(主査)					
	教授 田川 邦夫					
	(副査)					
	教授 萩原 文二 教授 和田 博					

論文内容の要旨

(目 的)

ミトコンドリア内のほとんどの蛋白質は、核のDNAにコードされ、細胞質のリボソーム上でその前駆体が合成された後、ミトコンドリア膜を通過して内部に移行する。この前駆体は特異的にミトコンドリアにとりこまれ、成熟型蛋白に変換する。従って、ミトコンドリア膜と相互作用するシグナルが前駆体の構造内に存在すると考えられるが、その前駆体の構造については、最近になって2つのミトコンドリア蛋白で報告されたのみである。本研究では、酵母ミトコンドリアのATPaseインヒビター蛋白の前駆体について、ミトコンドリア膜通過の機作の解明と前駆体の構造決定を目的とした。

(方法ならびに成績)

1) 前駆体の合成とミトコンドリアへの移行

酵母から調製したmRNAにより [^{35}S]—メチオニン存在下のウサギ網状赤血球溶血液の系で蛋白を合成し、特異抗体で沈降するATPaseインヒビター蛋白は、SDS—ゲル電気泳動、フルオログラフイで、成熟型より分子量が約2,000 大きい前駆体であった。前駆体は、単離した酵母ミトコンドリアによって成熟型サイズに変換するが、酸化的りん酸化能を失ったミトコンドリアでは、そのプロセッシングは認められなかった。また、酸化的りん酸化反応の阻害剤であるアンチマイシンAとオリゴマイシンの共存下ではプロセッシングされず、さらに脱共役剤(FCCP)によっても強く阻害されることから、前駆体のミトコンドリアへの移行、プロセッシングには、呼吸またはATP使用による内膜電位差の保持が必要と考えられる。

2) mRNAの部分精製と前駆体の部分構造

前駆体とミトコンドリア膜の相互作用を知る上で、前駆体の構造を明らかにする必要があるが、そのために、mRNAを精製し、無細胞系での前駆体の合成量を増大させなければならない。そこで、酵母の poly (A) RNA を Synchronapak GPC-500 の高速液体クロマトグラフィにより分画を行った。ATPase インヒビターはアミノ酸 63 残基の分子量約 7,400 の小分子蛋白であるため、その mRNA もサイズが小さく、他の多くの mRNA から分離できた。この他に不活性型 ATPase-安定化因子 (SDS-ゲル電気泳動で、分子量 9,000 および 15,000) の mRNA も分子サイズで分離することを確認し、この方法が、小分子の mRNA については、通常の密度勾配遠心法に比べ、簡便、迅速で、有効であることが示された。この mRNA により合成される ATPase インヒビター蛋白の前駆体量は、全合成蛋白の約 0.3 % になった。精製 mRNA を用い、Sephadex G-50 でアミノ酸プールを除いた網状赤血球の無細胞系 (アミノ末端のブロックを防ぐため、citrate synthase および oxaloacetate 添加でアセチル CoA を除去) を用い、種々の放射性標識アミノ酸存在下で蛋白合成を行ない、特異抗体によって各標識アミノ酸を含む ATPase インヒビター前駆体蛋白を精製した。この前駆体の一次構造を知るため、Edman 分解法によりアミノ末端からの逐次切断を行ない、各サイクルに回収される放射活性を調べた。 ^{35}S -メチオニンは、第 1 サイクルに効率よく回収された。 ^3H -グリシン、-セリンも第 1 番目に検出されたが、その活性は計算される量より非常に小さいことから、アミノ末端はメチオニンと結論される。 ^3H -セリンは、3, 5, 10, 15 番目の他に 22, 25 番目に回収されたが、ATPase インヒビター蛋白の成熟型はアミノ末端側が $\text{Ser}^1\text{-Glu}^2\text{-Gly}^3\text{-Ser}^4\text{-Thr}^5\text{-Gly}^6\text{----}$ であり、前駆体は分子量が約 2,000 大であることを考えると、22, 25 番目のセリン残基は、それぞれ成熟型の 1, 4 番目に相当すると予想された。このことは、 ^3H -グリシン標識前駆体において、16 番目の他に 24, 27 番目に放射活性が回収され、それぞれが成熟型の 3, 6 番の残基に対応することから確認された。ロイシンは 5 残基が検出され、分泌蛋白の前駆体と同様、extra ペプチドは疎水性であることが予想される。

(総括)

1. 酵母ミトコンドリアの ATPase インヒビター蛋白は、成熟型より分子量が約 2,000 大きい前駆体として合成される。前駆体のミトコンドリアへの移行、プロセッシングには、ミトコンドリア内膜の膜電位差の保持が必要である。
2. 酵母の Poly (A) RNA を Synchronapak GPC-500 カラムを用いた高速ゲル濾過クロマトグラフィにより分画し、ATPase インヒビター蛋白をコードする mRNA を約 30 倍に精製し、その前駆体蛋白の合成量を増大させた。
3. 精製 mRNA によって各標識アミノ酸を含む ATPase インヒビター蛋白の前駆体を大量に調製し、アミノ末端逐次決定法によってアミノ酸配列を分析した。その結果、アミノ末端にメチオニンをもち、21 残基のアミノ酸から成る分子量約 2,000 の extra ペプチドが、アミノ末端に位置していることが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

生体膜は高分子物質に対し、不透性の障壁であるが、分泌蛋白質やミトコンドリア蛋白質などは、それぞれ固有の生体膜を透過する。分泌蛋白質については粗面小胞体で合成されるペプチドが、アミノ末端に膜に親和性をもつ特殊な構造をもって、翻訳中に小胞体内腔に出ていくことが明らかにされている。ミトコンドリア蛋白質についても、分子量の大きな前駆体が細胞質で合成され、ミトコンドリアへ移行することがわかっている。前駆体の余分のペプチドがミトコンドリア膜の認識に関与することは疑いないが、ペプチド自体の分子構造が明らかでなく、膜透過機構の詳細は不明の点が多い。

本論文は前駆体と膜との相互作用を解明する上に大きい貢献をなすもので、医学博士の学位を授与するに値すると認めた。