

Title	Protein Sorting between the Outer and Inner Mitochondrial Membranes
Author(s)	中井, 正人
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/37075
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏必・(本籍)	なか	い	まさ	と
学位の種類	中	井	正	人
学位記番号	第	9053	号	
学位授与の日付	平成	2年	3月	24日
学位授与の要件	理学研究科生物化学専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	Protein Sorting between the Outer and Inner Mitochondrial Membranes (ミトコンドリア外膜、内膜への蛋白質局在化機構の解析)			
論文審査委員	(主査)	教授 松原 央		
	(副査)	教授 田川 邦夫	教授 二井 将光	

論文内容の要旨

真破細胞においてミトコンドリア蛋白質の大部分は核の遺伝子によりコードされており、これらの蛋白質は細胞質の遊離のリボゾーム上で合成されたのちミトコンドリアへ移行する。移行した蛋白質は、主たる小区画である外膜、膜間部、内膜、マトリックスのいずれかに配置される。したがってこれらのミトコンドリア蛋白質には、ミトコンドリアを認識する情報に加えて、ミトコンドリア内での局在位置を決定する情報も含まれているはずである。私は、酵母ミトコンドリア外膜の70 kDa蛋白質と、内膜蛋白質である cytochrome c_1 を材料とし、ミトコンドリア外膜、内膜への局在化機構について以下の研究を行なった。

外膜蛋白質は一般に分子サイズの大きな前駆体を持たず、成熟型分子と同じサイズで合成され、外膜に挿入される。私は、酵母ミトコンドリア外膜の分子量7万の蛋白質(以下70 kDa蛋白質)の局在化シグナルの同定を行なった。70 kDa蛋白質は機能は不明だが、外膜にN末端側のごく限られた領域で結合しており、C末端側の大部分は細胞質側に可溶性のドメインとして突出していることが証明されている。N末端側の配列は、9残基目までミトコンドリア蛋白質の延長ペプチドによく見られる塩基性アミノ酸に富む領域があり、それに続いて37残基目までは膜結合部と予想される28個の非解離性アミノ酸の配列が存在している。まず、70 kDa蛋白質の様々な長さのN末端側領域を、大腸菌 β -ガラクトシダーゼのN末端側に融合させた蛋白質をコードする融合遺伝子を作製し、酵母細胞に導入した。そして発現産物の挙動を β -ガラクトシダーゼ活性を指標として解析した。その結果、非ミトコンドリア蛋白質である β -ガラクトシダーゼのミトコンドリアへの局在化には、70 kDa蛋白質のN末端側12残基で十分であるが、ミトコンドリア内で外膜に局在化するためには、それに続く29残基目までの配列が必要であることがわ

かった。すた、外膜に留まれない分子種はマトリックスまで移行していた。以上の結果から70 kDa 蛋白質の外膜局在化は、N末端側12残基以内によるミトコンドリア識別と、それによって引き起こされるポリペプチド鎖のマトリックスへの膜透過を、後ろに続く膜結合部が外膜で停止させることにより起こると考えられる。また、ミトコンドリア内部へ移行する蛋白質でも、外膜へ移行する蛋白質でも、ミトコンドリア識別と、その後の初期過程は共通であることを示唆するものである。逆に言えば、そのような初期過程の後、外膜結合部の有無を認識し、蛋白質を外膜へかあるいはマトリックスへと分配する輸送機構がミトコンドリア側に備わっていると考えられる。

上で述べたようなN末端側の構造はミトコンドリア内膜へ移行する蛋白質の延長ペプチドにも見いだされている。例えば、酵母ミトコンドリア内膜のcytochrome c₁ 前駆体の延長ペプチドは61アミノ酸残基よりなり、その前半部は塩基性アミノ酸に富み、後半部36-54残基目には非解離性アミノ酸の配列が見られる。VanLoonらは、cytochrome c₁ 前駆体の延長ペプチドとマウスの細胞質蛋白質であるジヒドロ葉酸還元酵素との融合蛋白質を用いた実験により、延長ペプチド内にミトコンドリア識別と内膜局在化のためのシグナルが含まれていると結論した。そこで私は、70 kDa外膜蛋白質とcytochrome c₁ 前駆体のN末端側構造のどの領域にこれらの蛋白質を一方は外膜へ、他方は内膜へと局在化させるシグナルが含まれているのか明らかにする目的で、以下の実験を行なった。

cytochrome c₁ 前駆体の延長ペプチドの前半部、あるいは全部を、70 kDa蛋白質のN末端側の12, 29, 61残基と交換した変異cytochrome c₁ 遺伝子を作製し、cytochrome c₁ 欠損の酵母株へ導入した。そして、各形質転換株について発現産物の局在位置と呼吸能の回復を調べたところ、cytochrome c₁ 前駆体の延長ペプチドの前半部を、70 kDa蛋白質のN末端側12, 29残基と交換したものでは呼吸能の回復がみられ、発現産物は内膜に局在し呼吸鎖複合体Ⅲに組み込まれていた。一方、70 kDa蛋白質のN末端側61残基と交換したものでは呼吸能の回復が見られず、発現産物は外膜に局在していた。以上の結果はcytochrome c₁ 前駆体の延長ペプチドの前半部は70 kDa蛋白質のミトコンドリア識別シグナルと交換可能であり、それ自身はcytochrome c₁ 分子の膜特異的な局在化には直接は関与していないことを示しており、その後ろに続く非解離性アミノ酸の領域がそれぞれ外膜か、あるいは内膜への膜特異的な局在化シグナルとして働いていると考えられる。また、cytochrome c₁ 前駆体の延長ペプチド全体を70 kDa蛋白質のN末端側12, 29残基と交換したものでも呼吸能の回復がみられ、発現産物は内膜に局在し複合体Ⅲに組み込まれていた。この結果は、cytochrome c₁ のミトコンドリア内膜への局在化に、ミトコンドリア識別シグナルだけで十分であることを示している。これらの融合蛋白質の内膜への局在化がいかなる過程を経るか興味のあるところだが、成熟型cytochrome c₁ 分子の領域のどこかが内膜への局在化シグナルとして関与している可能性も考えられる。

ミトコンドリアへの蛋白質の輸送に関しては、輸送される蛋白質の局在化シグナルに関する研究は多く報告されているが、ミトコンドリア側の輸送機構は、ほとんど解明されていない。そこで私はこの輸送機構に関与する因子を同定する目的で以下の実験を行なった。

上でも述べたようにcytochrome c₁ 前駆体の延長ペプチドを70 kDa外膜蛋白質の外膜局在化シグナルを完全に含むN末端側61残基と交換したものでは、発現産物は外膜に局在しcytochrome c₁ 欠

損株の呼吸能は回復しない。この形質転換株を変異剤で処理し呼吸能が回復した酵母突然変異株を単離した。これらの変異株の中には酵母ゲノム上の突然変異により、本来外膜に局在化するはずの70 kDa-cytochrome c_1 融合蛋白質が内膜にまで到達し呼吸能が回復したものが含まれていた。遺伝的解析の結果、この変異株における変異は優性でありクローニングが可能であると判断した。そこでこの変異株の遺伝子ライブラリーを上記の70 kDa-cytochrome c_1 融合遺伝子を含むシャトルベクター上に構築し、cytochrome c_1 欠損株の呼吸能の回復を指標としてスクリーニングを行なった。その結果、1,086 bp よりなるORFを含む21 kbのDNA断片が得られた。このORFによってコードされる蛋白質は分子量40,343であり、nucleotide binding siteと予想される配列を有していた。次にこのORFの一部を大腸菌で発現させ、その産物を抗原として抗体を作製した。Western blot法によって酵母細胞内でのこのORFの発現産物は、分子量40 kDaと確認され、ミトコンドリア外膜に局在することがわかった。ミトコンドリアへの蛋白質の移行の様々な段階にATPが要求されるという報告も多くあり、この遺伝子産物が、ミトコンドリア外膜に局在すること、nucleotide binding siteと予想される配列を有することなどより、ミトコンドリア外膜上で、蛋白質輸送におけるATP要求性の初期の段階に関与しているのではないかと考えている。今後、この遺伝子産物の働きについて詳細な解析を進める予定である。

論文の審査結果の要旨

真核細胞ミトコンドリア蛋白質の大部分は核遺伝子でコードされ、合成後ミトコンドリアへ移行する。そして外膜、膜間部、内膜、マトリックスにそれぞれ配置される。この配置の情報は、ミトコンドリアへの移行の情報とともに蛋白質の構造部位に含まれていると考えられている。中井君はまず酵母ミトコンドリア外膜局在性70 kDa蛋白質の局在化シグナルがアミノ末端側にあることを融合蛋白質の作成と、その詳細な解析によって明確にした。すなわち末端の12残基にはミトコンドリアを識別する情報とそれに続くマトリックスへのポリペプチド鎖の膜透過への誘導があること、そしてそれに続く29残基目までがポリペプチド鎖を外膜に留置させるシグナルをもっているということである。と同時にこの研究はミトコンドリア外膜そのものにも分配や輸送機構があることを暗示しており、次の研究への糸口となっている。次いでアミノ末端側延長ペプチド内にミトコンドリア識別と内膜局在化の両シグナルをもつとされるチトクロム c_1 の遺伝子を適宜70 kDaアミノ末端部コードのものと交換し、酵母ミトコンドリアへの融合蛋白質の移行をしらべた。その結果チトクロム c_1 の末端前半部は70 kDa蛋白質のものと同様ミトコンドリア識別機能をもつことがわかったが、チトクロム c_1 のそのあとに続く部分は従来の知見とは必ずしも一致せず、成熟チトクロム c_1 の中に内膜認識部があるのではないかとと思われる成果をえた。さてこれにつづく研究ではチトクロム c_1 を外膜に留めるようにデザインしたものが、今度は外膜の変異で内膜に移行しうるような変異酵母株を作成してこの変異した蛋白質をもつものを単離し、その遺伝子をクローニングし、1086塩基対から成るORFの構造を決定した。分子量約4万の外膜局在蛋白質であり、その配列の中にヌクレオチド結合部位と思われるものがあり、従来からミトコンドリアへの蛋白質移行の各ステップに

ATPの必要性が認められていることを考え合わせると大へん興味深く、かつ重要な発見である。今後の発展も大いに楽しみである。以上この論文は理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。