The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The histidine residue of codon 715 is essential for function of elongation factor 2
Author(s)	大村, 文彦
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37667
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

【32】

氏　　名	大　村　文　彦（おおむら ふみひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　9940　号
学位授与年月日	平成3年11月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	The histidine residue of codon 715 is essential for function of elongation factor 2 （ペプチド鎖伸長因子－2の715位のヒスチジンは機能的に必須である）
論文審査委員	（主査） 教授　上田　重晴 （副査） 教授　松田　守弘　　教授　岡山　博人

論文内容の要旨

〔目　的〕

ペプチド鎖伸長因子－2（EF－2）は分子量約10万の蛋白質であり，真核生物の蛋白質合成に必須の因子である。EF－2はGTP加水分解活性をもち，リボゾーム上のペプチジルtRNAをA部位からP部位へ転移させる働きを有する。EF－2は715番目のアミノ酸残基としてジフタマイドと呼ばれる特殊なアミノ酸を有するが，これはヒスチジン残基が数段階の酵素的修飾をうけて形成される構造である。ジフテリア毒素（DT）や緑膿菌エクソトキシンA（PA）はEF－2を標的とし不活化するが，そのメカニズムはジフタマイド部位のADP－リボシル化であることが知られている。EF－2のADP－リボシル化は細胞に内在性の酵素によっても行なわれることが報告されており，EF－2のリン酸化とともに細胞内の蛋白質合成調節に翻訳段階で関わっていることが予想されている。

本研究ではEF－2の構造と蛋白質合成における機能，及び毒素によるADP－リボシル化との相関を明らかにする目的で，ジフタマイドを形成する715位のヒスチジン及びその近傍のアミノ酸を部位特異的変異によって変換し，得られた変異型EF－2の細胞内での活性や毒素に対する感受性を解析した。

〔方法ならびに成績〕

○変異型EF－2の作製

Kohno ら[a]によって得られたハムスターのEF－2のcDNAを材料とし，合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異の手法で7種の変異型EF－2（〔Pro^{713}〕，〔Asp^{715}〕，〔Arg^{715}，Gly

^{716}〕，〔Ile^{713}〕，〔Lys^{715}〕，〔Arg^{715}〕，〔Gln^{717}〕）を作成した。また，毒素耐性型として別途単離された〔Arg^{717}〕EF-2[b]も対照として解析に用いた。

○マウス細胞で発現された変異型EF-2の蛋白質合成機能と毒素耐性について

上述した8種の変異型及び天然型EF-2をSV40 earlyプロモーターを用いリン酸カルシウム法によってマウスL細胞中でトランジェントに発現させ，0.05μg/mlのPA毒素存在下での細胞の蛋白質合成能を〔^{3}H〕ロイシンの酸不溶画分へのとり込みによって調べた。これは毒素存在下で細胞を培養することによりマウス細胞に内在するEF-2を不活化し，導入した外来性の変異型EF-2の寄与による蛋白質合成の結果のみを観察できる実験系である。

この結果，天然型EF-2のHis-715を他のアミノ酸に変換した変異体4種（〔Asp^{715}〕，〔Arg^{715}, Gly^{716}〕，〔Lys^{715}〕，〔Arg^{715}〕）は蛋白質合成を全く行えないことが判明した。これら4種の変異体はADP-リボシル化を受けるべきジフタマイドを持たないので毒素の存在には非依存的にEF-2としての活性を失ってしまったものと考えられる。一方，天然型及び〔Ile^{713}〕の場合は高発現しているこれらのEF-2が毒素によるADP-リボシル化によって漸次に不活化されていくのを反映して一時的なごく僅かの毒素耐性を示した。また，他の変異体2種EF-2（〔Pro^{713}〕，〔Gln^{717}〕）は〔Arg^{717}〕EF-2の30%程度に達する顕著な毒素耐性を示した。これらの変異型EF-2は形質転換細胞の解析から天然型EF-2と比べ試験管内で100倍以上DT毒素によってADP-リボシル化されにくいことが判明した。

○変異型EF-2の活性型EF-2の機能に対する競争的阻害

本研究で作成したHis-715を欠く不活性型EF-2が細胞内で活性型EF-2を競争的に阻害するかどうかを調べた。マウスL細胞に毒素耐性型〔Arg^{717}〕EF-2と各不活性型EF-2のDNAを同時に導入して毒素存在下で培養後，細胞の蛋白質合成能を測定する方法で行った。この結果，His-715を欠く不活型EF-2はADP-リボシル化された天然型EF-2と同様，活性型EF-2による蛋白質合成を競争阻害することが判明した。さらにこの阻害は715位に天然型EF-2のHisと同じ塩基性アミノ酸を有する〔Lys^{715}〕と〔Arg^{715}〕において顕著であることが明らかとなった。

〔総　括〕

ジフタマイドという形で存在するEF-2の715位のヒスチジン残基の生理的意義はADP-のリボシル化によるEF-2活性の調節部位としての可能性以外には知られていない。本研究では715位のヒスチジンを他のアミノ酸残基に変換することにより，このヒスチジン残基がEF-2の活性にとって必須のものであることを証明した。また，ジフタマイド部位の種々の変異型EF-2が様々な程度の阻害効果を示したことから，ジフタマイド近傍の構造がEF-2のリボゾームへの結合という機能にかなり関与していることが示唆された。

a) Kohno.K. et al. (1986) Proc. Natl Acad. Sci. USA 83, 4978-4982
b) Kohno.K. & Uchida, T. (1987) J. Biol. Chem. 262, 12298-12305

論文審査の結果の要旨

ペプチド鎖伸長因子－2（EF－2）は真核生物の蛋白質合成に必須の因子で，715位のアミノ酸残基としてジフタマイドと呼ばれる特殊なアミノ酸を有している。ジフタマイドは，ヒスチジン（His）残基が翻訳後，酵素的修飾を受けて形成される構造で，ジフテリア毒素や緑膿菌毒素によって特異的にADP－リボシル化を受ける部位である。Hisのジフタマイドへの修飾の生理的意義は解明されていないが，必ずしもEF－2の活性には必要の無いことが知られている。本研究では，部位特異的変異の手法により715位のHisを種々のアミノ酸に置換し，His残基がEF－2の活性に必須であることを示している。この結果は，これまで毒素耐性型のEF－2として715位のHisが他のアミノ酸に変換されたものが見出されていない事実とよく一致する。また，本研究では715位のHis及びその近傍の配列がEF－2のリボゾームとの結合に大きく関わっていることも示しており，EF－2・GTP・リボゾーム複合体の形成メカニズムの研究にも重要な知見を与えていると思われる。学位を授与するに値すると判断する。