



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37667">https://hdl.handle.net/11094/37667</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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	大 村 文 彦
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 9 9 4 0 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-リボシル化は細胞内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<sup>1)</sup> 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<sup>713</sup>], [Asp<sup>715</sup>], [Arg<sup>715</sup>, Gly

<sup>716</sup>], [Ile<sup>713</sup>], [Lys<sup>715</sup>], [Arg<sup>715</sup>], [Gln<sup>717</sup>])を作成した。また、毒素耐性型として別途単離された [Arg<sup>717</sup>] EF-2<sup>a)</sup> 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、0.05 µg/ml の PA 毒素存在下での細胞の蛋白質合成能を [<sup>3</sup>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<sup>715</sup>], [Arg<sup>715</sup>, Gly<sup>716</sup>], [Lys<sup>715</sup>], [Arg<sup>715</sup>]) 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ミ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<sup>713</sup>] 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<sup>713</sup>], [Gln<sup>717</sup>]) は [Arg<sup>717</sup>] 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<sup>717</sup>] 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 を欠く不活性型 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<sup>715</sup>] と [Arg<sup>715</sup>] において顕著であることが明らかとなった。

#### 〔総括〕

ジフタミ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、ジフタミ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、ジフタミド近傍の構造が 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。