



Title	酵母EF-2遺伝子の単離、及びそれを用いたジフタマイド部位の解析
Author(s)	木俣, 行雄
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38107
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 木 侯 行 雄

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 10611 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学研究科生理系専攻

学 位 論 文 名 酵母 EF-2 遺伝子の単離, 及びそれを用いたジフタマイド部位の解析

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 米田 悦啓

(副査)
教 授 田中亀代次 教 授 上田 重晴

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

真核生物のポリペプチド鎖伸長因子2 (elongation factor 2, EF-2) は分子量約10万のタンパク質であり, リボソーム上でのポリペプチドの転移酵素として働く。EF-2 は翻訳後多段階の修飾を受け, 1 残基のHis がジフタマイドと名付けられた特有の構造をとっている。ジフタマイドはジフテリア毒素 (DT) や緑膿菌外毒素 A によって ADP リボシル化を受け, それによって EF-2 は不活性化される。ジフタマイドを持つタンパク質は EF-2 しか知られていない。ジフタマイドが EF-2 の持つ転移酵素としての触媒活性に直接的に必須であるかどうか, またそれ以外に何か別の役割を持つかどうか, といったジフタマイドの生理的な機能に関することは現在のところ全くわかっていない。そこで私は遺伝的操作が容易な出芽酵母 (*S.cerevisiae*) から EF-2 遺伝子を単離し, そのジフタマイド部位に相当するヌクレオチド配列を人為的に改変し, その変異遺伝子を酵母に導入した時の影響を調べ, ジフタマイドの生理的な役割を考察した。

(方法ならびに成績)

ハムスター EF-2 cDNA をプローブとして, 酵母遺伝子ライブラリーより 3.8kb の EcoRI-EcoRI 断片の酵母 EF-2 遺伝子 (EFT2) を単離した。EFT2 をプローブとした酵母 DNA のサザンブロットの結果, 酵母には haploid あたりの 2 コピーの EF-2 遺伝子が存在することがわかった。そこで, EFT2 をプローブにしてもうひとつの EF-2 遺伝子, すなわち EFT1 を 3.9Kb の PstI-PstI 断片として単離した。EFT2 と EFT1 は 842 残基からなる全く同一のタンパク質 (EF-2) をコードしており, 哺乳動物の EF-2 に比べ 16 アミノ酸残基短く, 酵母のジフタマイドは 699 番目にコードされる His に相当することがわかった。ハムスターと酵母の EF-2 を比べると, アミノ酸配列は良く保存されており, EF-2 全体として同一アミノ酸が 64 % を占めていた。特にジフタマイドを含む前後 20 アミノ酸配列においては, 同一アミノ酸が 95 % という非常に高いホモロジーを示し, この領域が EF-2 の機能に関して重要であることが示唆された。また, プロモーター領域を含む 5' および 3' 非翻訳領域は EFT2 と EFT1 の間で相同性は全く認められなかった。なお, EFT2 は 4 番染色体上に, EFT1 は 15 番染色体上に存在していることも示された。

次に, 欠損変異遺伝子との相同組換えにより EFT2 もしくは EFT1 が破壊された haploid を作成し, その性状を調べた。EFT2 が破壊された株および EFT1 が破壊された株はそれぞれ野生型株の 39% および 68 % の量の EF-2 を

細胞内に持っており、増殖速度も野生型株より若干遅かった。EFT 2 が破壊された株と EFT 1 が破壊された株をかけ合わせて得た diploid より胞子を作り、その発芽能を調べた。EFT 2 と EFT 1 の両方が破壊された胞子は発芽できず、EF-2 は細胞にとって必須の因子であることが示された。

次に、ジフタマイドに修飾される His (699) を他の 19 種類のアミノ酸に置換したとき、EF-2 の機能が保たれるかどうかについて検討を加えた。まず、染色体上の EFT 2 および EFT 1 の両方が破壊されており、YCp 型のプラスミドとして野生型の EFT 2 が導入されている酵母を作成した。そこに変異型の EFT 2 を YCp 型のプラスミドとして導入し、ついで野生型の EFT 2 の乗ったプラスミドを脱落させ、その後増殖を調べた。ジフタマイドに修飾される His が Ala, Leu, Ile, Val, Phe, Met, Cys, Asn, Gln, Glu, Thr, Tyr, Trp の 13 種のアミノ酸に置換された場合も、酵母は増殖できることがわかった。しかし、それらの酵母の増殖は野生型株より遅かった。このことから、ジフタマイド構造が全くとれない場合でも EF-2 はある程度の活性を維持することが示された。

次に、ジフタマイドに修飾される His より 2 残基 C 末側の Gly を Arg に置換した変異型 EF-2 のみを発現している酵母を作成した。ハムスター培養細胞では、この変異によって DT 耐性になることが知られている。この酵母の細胞内で DT フラグメント A を発現させた場合、酵母は予想どおり DT に耐性を示した。また、この酵母由来の EF-2 は DT フラグメント A によって ADP リボシル化されなかった。この酵母と野生型酵母では、増殖速度は全く同じであり、熱ショックや高密度培養といったストレス時の生存性、および接合能や発芽能も両者の間で差は認められなかった。

(総括)

1. 酵母より 2 種の EF-2 遺伝子を単離し、一次構造を決定した。また、遺伝子破壊実験により、EF-2 は細胞にとって必須の因子であることを明らかにした。
2. ジフタマイドに修飾される His (699) は、他の 13 種のアミノ酸で相補された。ジフタマイドは EF-2 が持つ転移酵素として活性に必ずしも必要でないことが明らかになった。
3. DT 耐性を示す EF-2 [Gly (701)→Arg] のみを発現している酵母の栄養増殖や生活環は、野生型と比べて差異は認められなかった。

論文審査の結果の要旨

ポリペプチド鎖伸長因子 2 (EF-2) 特有のアミノ酸残基であるジフタマイドはジフテリア毒素の標的として知られており、その構造も決定されていたが、生理的意義に関しては全く不明であった。木俣君は本研究において、まず、酵母より EF-2 遺伝子を単離し、遺伝子破壊実験から EF-2 が細胞にとって必須の因子であることを明らかにした。さらに、その遺伝子を使って、酵母の遺伝学を用いた独自の視点からジフタマイドの生理的意義を検討した。そして、ジフタマイドが EF-2 の伸長因子としての機能は必ずしも必要ではないことを明らかにし、ジフタマイドの整理的意義を知るための一端を開いた。よって、本論文は博士論文として十分な価値があるものと認められる。