

哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成における
G タンパク質の機能解析

2013 年 3 月

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻

分子医科学分野

小谷 哲也

目次

1. 緒言	3
1-1. 哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成系	3
1-2. 哺乳類ミトコンドリアのリボソーム	4
1-3. リボソームの生合成における G タンパク質	5
1-4. ObgH1	6
1-5. Mtg1	8
1-6. 本研究の目的	9
2. 実験方法	10
2-1. 細胞培養	10
2-2. ヒト培養細胞からのミトコンドリアの調製	10
2-3. ミトコンドリアの細分画	10
2-3-1. ミトコンドリアの細分画-1	10
2-3-2. ミトコンドリアの細分画-2	11
2-3-3. ミトコンドリアの細分画-3	11
2-4. Proteinase K assay	12
2-5. ObgH1、Mtg1 の発現と精製	12
2-6. ミトコンドリアリボソームの調製	13
2-6-1. ブタ肝臓からミトプラストの調製	13
2-6-2. ミトプラストからクルードリボソームの調製	13
2-6-3. クルードリボソームから 55S ミトコンドリアリボソームの調製	14
2-6-4. 28S 小サブユニット、39S 大サブユニットの調製	15
2-7. <i>E. coli</i> リボソームの調製	15
2-8. Ribosome-binding assay	15
2-9. Double stranded RNA (dsRNA) transfection	16
2-10. Mitochondrial translation assay (パルスラベル法)	16
2-11. RNA isolation and northern blotting	17
2-12. Blue native PAGE	17
2-13. GTPase 活性の測定	18
2-14. クロスリンク実験	18
2-15. C10orf46 安定発現株の作製	19
2-16. Bi-molecular fluorescent complementation 実験	19
2-17. 本研究で用いた抗体	20

2-18. 抗体の精製	20
3. 結果	22
3-1. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリア内局在	22
3-2. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリアリボソームとの相互作用	23
3-3. ObgH1、Mtg1 をノックダウンした時に与える影響	24
3-3-1. ミトコンドリア rRNA とリボソーム蛋白質の解析	25
3-3-2. ミトコンドリアの翻訳活性の解析	26
3-3-3. 呼吸鎖複合体のサブユニットの解析	26
3-3-4. 呼吸鎖複合体のアセンブリーの解析	27
3-4. ObgH1、Mtg1 の GTPase 活性測定	28
3-5. Mtg1 とミトコンドリアリボソームのクロスリンク	29
3-6. C10orf46 のミトコンドリア局在の検証	30
3-7. Mtg1 と C10orf46 の相互作用の検証	31
4. 考察	32
4-1. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリア内局在	32
4-2. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリアリボソームとの結合と GTPase 活性	32
4-3. Mtg1 をノックダウンした時の細胞に与える影響	35
4-4. ObgH1 をノックダウンした時の細胞に与える影響	36
4-5. Mtg1 とミトコンドリアリボソームとのクロスリンク	38
4-6. ObgH の作業仮説	39
4-7. Mtg1 の作業仮説	39
5. 表と図	40
6. 参考文献	74
7. 謝辞	80

1. 緒言

1-1. 哺乳類ミトコンドリアの蛋白質合成系

ミトコンドリアには、核とは別に独自の DNA(mtDNA)がある。哺乳類では1個のミトコンドリア内に数コピーの mtDNA が存在する。哺乳類の mtDNA はおよそ 16,000 塩基対の環状二本鎖 DNA であり、2 個のリボソーム RNA(rRNA)と、22 個の tRNA、13 個の蛋白質の遺伝子がコードされている(図 1)。¹⁾ この 13 個の蛋白質を翻訳するためにミトコンドリアには細胞質とは独立した独自の蛋白質合成系が存在している。mtDNA にコードされている 13 個の蛋白質は全て呼吸鎖複合体のサブユニットである。呼吸鎖複合体は Complex I (NADH 脱水素酵素)、Complex II (コハク酸脱水素酵素)、Complex III (シトクロム bc1 複合体)、Complex IV (シトクロム c 酸化酵素)、Complex V (ATP 合成酵素)の 5 個の複合体から構成される。Complex II は核の DNA にコードされた蛋白質のみで構成されているが、他の 4 個の複合体は核にコードされたサブユニットと mtDNA にコードされたサブユニットから構成されており、ミトコンドリア内膜上で組み合わさって活性を持つようになる。

ミトコンドリアは真核細胞に細菌が共生してできた細胞小器官と言われており、ミトコンドリアの蛋白質合成系の基本的なメカニズムはバクテリアの蛋白質合成系と類似している。その一方で、ミトコンドリアの蛋白質合成系に特有な点もいくつか知られている。^{2), 3)} ミトコンドリアの mRNA はまず 2 個の長い polycistronic な前駆体 mRNA として転写される。その後、プロセッシングやポリアデニル化を受けて 11 個の mRNA と成熟していく。11 個のうち 9 個は monocistronic、2 個は bicistronic な mRNA である。2 個の bicistronic な mRNA はそれぞれ ATP8 と ATP6、ND4L と ND4 をコードしており、どちらもオーバーラップした領域を含んでいる。ミトコンドリアの mRNA はバクテリアの mRNA で見られる Shine-Dalgarno 配列や真核細胞の細胞質の mRNA に見られる Cap 構造はなく、先導配列を欠いた leaderless mRNA となっている。また、異常構造を持った tRNA が使用されていることや、変則暗号を使用していることもミトコンドリア蛋白質合成系に特有のものとなっている。^{2), 3)}

1-2. 哺乳類ミトコンドリアのリボソーム

哺乳類の mtDNA にコードされた蛋白質はすべて膜タンパク質であり、これらの膜タンパク質を合成するためにミトコンドリアリボソームはマトリクス側から内膜に相互作用していると言われている。⁴⁾ 哺乳類ミトコンドリアのリボソームの沈降係数は 55S で、大サブユニットと小サブユニットの沈降係数はそれぞれ 39S と 28S である。ミトコンドリアリボソームは抗生物質に対する感受性の類似性などからバクテリアに類似したリボソームと考えられている。⁵⁾ ミトコンドリアのリボソームの分子量は約 2.7×10^6 Da であり、*E. coli* のリボソームの分子量とほぼ同じだが、rRNA 成分は半分もなく、リボソーム蛋白質の数は 2 倍以上ある。そのため浮遊密度が低くなり、沈降係数がバクテリアのリボソーム(70S)よりも低くなっている。⁶⁾ ミトコンドリアのリボソームのリボソームタンパク質は約 80 個あり、すべて核の DNA にコードされている。小サブユニットのリボソーム蛋白質は 29 個あり、その中で 14 個はバクテリアのリボソームにホモログを持つ (表 1)。大サブユニットのリボソーム蛋白質は 48 個あり、その中で 28 個はバクテリアのリボソームにホモログを持つ (表 2)。ミトコンドリアの rRNA は 12S rRNA と 16S rRNA があり、どちらも mtDNA にコードされている。バクテリアのリボソームの 5S rRNA に対応する 3 個目の rRNA は見つからない。ミトコンドリアのリボソーム蛋白質は細胞質で翻訳された後ミトコンドリアに輸送される。ミトコンドリアの rRNA はミトコンドリアで転写される。違う場所で合成されたりボソーム蛋白質と rRNA が組み合わさって、ミトコンドリアリボソームは出来上がるが、ミトコンドリアリボソームの生合成機構については、アセンブリーの機序をはじめとして細胞周期とどのように連動しているかなど、あまり理解されていない。近年、表 3 に示すようにミトコンドリアのリボソーム蛋白質の変異による神経変性疾患などのヒト疾患の発症が報告されている。⁷⁾⁻¹⁵⁾ MRPL3、MRPL32、MRPS16、MRPS22 の異常による疾患ではリボソームの生合成の異常が示唆されている。このような疾患の発症機構を理解するためにはリボソームの生合成機構の解明が必要であると考えられる。

1-3. リボソームの生合成における G タンパク質

リボソームの生合成では rRNA のプロセッシングや修飾とリボソーム蛋白質の組み込みが協調的に行われている。これらの過程は helicase や修飾酵素、G タンパク質(GTPase) などの様々な生合成因子によって制御されている。本研究では生合成に関わる GTPase に着目した。バクテリアのリボソームの生合成に関わる GTPase は 5 個のファミリー (Obg、YihA、Era、YfgK(EngA)、YlqF/YawG) に分類される。¹⁶⁾ リボソームの生合成に関わる GTPase の多くは生育に必須であり、これらの GTPase に変異を加えると細胞内での 70S リボソームの量が減少するという共通の表現型を示すことが知られている。^{17), 18)} また、リボソームの生合成に関わる GTPase は真核細胞にも広く保存されている。リボソームの生合成に関わる GTPase を欠損させた時に蓄積するリボソームの前駆体に含まれるリボソーム蛋白質や rRNA の解析により、GTPase の欠損によってどのような未成熟なリボソームが蓄積するのかがよく調べられている。しかし、GTPase の機能に関する詳細な分子メカニズムはあまりわかっていない。その中で、*E. coli* のリボソームの生合成に関わる GTPase である Era や RsgA に関しては解析が進んでいる。Era は後期に組み上がる小サブユニットのリボソーム蛋白質のリボソームへの結合速度を上げると言われている。¹⁹⁾ また、RsgA はリボソームの小サブユニットの生合成の後期においてリボソームの生合成因子である RbfA を解離させる働きがあることが知られている。²⁰⁾ このように GTPase はリボソームの生合成において様々な働きをされると考えられる。

これまでに酵母のミトコンドリアでは 3 つの GTPase (Mtg1, Mtg2, Mtg3) がミトコンドリアリボソームの生合成に関わることが知られている。²¹⁾⁻²³⁾ Mtg1 と Mtg2 は大サブユニットの生合成、Mtg3 は小サブユニットの生合成に関与していると言われている。哺乳類ミトコンドリアにおいては、mtRsfA/C7orf30 が大サブユニットの生合成に関与していると報告されている。²⁴⁾⁻²⁶⁾ また、2 つの GTPase、ERAL1 と NOA1/C4orf14(酵母 Mtg3 のホモログ) が小サブユニットの生合成に関与すると言われている。²⁷⁾⁻²⁹⁾ 本研究では酵母の Mtg1 のホモログであるヒトの Mtg1(アミノ酸のアライメントを図 2 に示す) と酵母の Mtg2 のホモログである ObgH1(アミノ酸のアライメントを図 3 に示す) の機能解析を行った。

1-4. ObgH1

ObgH1 はミトコンドリアに局在する Obg ファミリー蛋白質である。³⁰⁾ Obg ファミリー蛋白質は細菌から真核細胞において広く保存されている GTPase であり、¹⁶⁾ リボソームの生合成やストレス応答、胞子形成、染色体分配、DNA 複製など様々な細胞内プロセスに関わると言われている。¹⁸⁾ ここではリボソームとの関係についてを中心に説明する。

バクテリアの Obg 蛋白質はリボソームの 50S サブユニットと相互作用する。^{31), 32)} また、*B. subtilis* では Obg 蛋白質がリボソーム蛋白質である L13 と相互作用することが示されており、³³⁾ L13 を介して Obg 蛋白質はリボソームの大サブユニットと相互作用すると考えられる(図 1)。Obg 蛋白質とリボソームの結合にヌクレオチドが必要かどうかの解析も行われてきた。細胞抽出液を用いた解析ではヌクレオチドが存在してもしなくても、さらにはグアニンヌクレオチドの種類にかかわらず 50S に結合する。³²⁾ しかし、精製した 70S リボソームを用いた場合には GTP の非加水分解アナログである GDPNP 存在下で強く結合し、GDP 存在下ではほとんど結合しない。³²⁾ また 30S にも結合することが示されている。^{31), 32)} さらに Obg 蛋白質は精製した 16S や 23S rRNA と GTP 存在下でのみ結合することが示されている。³¹⁾ これらのことから Obg 蛋白質は GTP 型でリボソームと相互作用すると考えられる。

E. coli の Obg 蛋白質である ObgE の機能を欠損させた株のリボソームプロファイルを調べると、70S リボソームが減り、30S と 50S サブユニットが増え、同時に 50S の前駆体が出現する。^{31), 32)} さらに RNA のプロセッシングに異常が起き、16S と 23S rRNA の前駆体が蓄積する。^{31), 32)} 50S の前駆体ではリボソーム蛋白質 L33、L34、L16 といった後期に組み上がっていくリボソーム蛋白質の量が減っている(図 4、5)。これより、ObgE はリボソームの後期の assembly に関わっていると考えられている。³²⁾

酵母のミトコンドリアに局在する Obg 蛋白質である Mtg2 はミトコンドリアの内膜にマトリクス側から相互作用し、ミトコンドリアのリボソームの大サブユニットに結合する。²²⁾ Mtg2 の機能を欠失させた株ではミトコンドリアの翻訳能に異常が生じ、呼吸鎖複合体の Complex IV のサブユニットである COI と COIII、Complex III のサブユニットである Cytb の翻訳量は減少し、Complex IV のサブユニットである COII の翻訳

量は増加する。またそのときのミトコンドリアリボソームのプロファイルを見ると、小サブユニットと大サブユニットの割合はあまり変化しないがサブユニット全体の量が減る。²²⁾ また生合成の初期に組み込まれるリボソーム蛋白質でリボソームに組み込まれないと不安定である Mrp13 や Mrp49 の細胞内での蛋白量は Mtg2 の機能を欠損させても変化がないことから、Mtg2 はリボソームの初期の生合成には関与しないと考えられている。²²⁾

バクテリアの RrmJ は 23S rRNA の peptidyl transferase center にある U2552 を修飾するメチルトランスフェラーゼである。rrmJ の欠損株では rRNA の修飾がおきなくなり、70S リボソームが減少し、同時に 30S と 50S サブユニットが増える。³⁴⁾ *E. coli* の Obg の過剰発現は rrmJ の欠損によるポリソームプロファイルの変化を回復させるが、このとき U2552 の修飾は起きていないことが知られている。³²⁾ 酵母の場合、RrmJ のホモログである Mrm2 はミトコンドリアのリボソームの大サブユニットの rRNA である 21S rRNA の U2791 をメチル化する役割があり、mrm2 の欠損は呼吸欠損を示すが、酵母の Mtg2 の大量発現は mrm2 の欠損を相補できる。²²⁾ これらのことからバクテリアや酵母ミトコンドリアの Obg 蛋白質はリボソームの生合成に関与していると考えられる。

ヒトには Obg 蛋白質が 2 つ知られており、ObgH1 と ObgH2 がある。どちらも *E. coli* の ObgE の欠損による生育障害を相補できることから、ObgE と同様の機能を持っていると考えられる。³⁰⁾ 免疫染色法により、ObgH1 はミトコンドリアに、ObgH2 は核小体に局在すること知られており、³⁰⁾ ObgH1 と ObgH2 はそれぞれミトコンドリアと核小体で ObgE と同じような機能、すなわちリボソームの生合成に関与しているのではないかと考えられる。

1-5. Mtg1

Mtg1 は細菌（グラム陽性菌）から真核細胞において保存されている YlqF/YawG ファミリー蛋白質である。

B. subtilis では YlqF/YawG ファミリー蛋白質である YlqF の欠損により 70S リボソームが減少し 50S の前駆体である 45S 中間体が蓄積することが知られている。³⁵⁾⁻³⁸⁾ このことから YlqF はリボソームの大サブユニットの生合成過程で働くと考えられている。この 45S 中間体にはリボソーム蛋白質 L16、L27、L36 が欠落している。³⁵⁾⁻³⁸⁾ L16、L27、L36 の大サブユニットにおける位置は図 6 の通りであり、45S 中間体では A 位、P 位や peptidyltransferase center (PTC) が正しい構造を取れていないのではないかと考えられている。¹⁸⁾ YlqF は 45S 中間体や 50S 大サブユニットと GTP 型で相互作用するが、50S との結合は GTP の非加水分解アナログである GTP γ S の存在下でないと観察されない。³⁵⁾ また、YlqF の GTPase は 50S 大サブユニットによって活性化されるが、45S 中間体では活性化されない。³⁹⁾ これらのことから、YlqF が GTP 型で未成熟のリボソームの大サブユニットに結合すると、L16、L27、L36 がリボソームにリクルートされ、リボソームが成熟すると YlqF が GTP を加水分解してリボソームから解離すると考えられている。

YlqF がリボソームのどの位置に結合するのかについてはリボソーム蛋白質と rRNA について解析が行われている。rRNA の結合部位については DMS footprint 解析が行われている。この解析によって YlqF が大サブユニットに結合すると、23S rRNA の Helix 38 にある C928 と C942、Helix81 にある A2301、Helix 85 にある A2354 が保護されることがわかった。³⁵⁾ リボソーム蛋白質との結合については Yeast two-hybrid 法や pull down 法を用いた実験が行われている。これらの実験により YlqF は L25 と相互作用することがわかっている(図 6)。³⁵⁾

酵母のミトコンドリアの YlqF/YawG ファミリー蛋白質である Mtg1 はミトコンドリアの内膜にマトリクス側から相互作用しているが、ミトコンドリアのリボソームとは相互作用していないと言われている。²¹⁾ Mtg1 の変異はミトコンドリアの rRNA の分解やミトコンドリアの翻訳活性の低下をもたらし、その結果、呼吸欠損を引き起こす。²¹⁾ また大サブユニットの rRNA の domain V と central peptidyl transferase domain をつ

なぐシステム内の点変異が *mtg1 null* 変異体のミトコンドリア翻訳活性異常を抑制できることがわかっている。²¹⁾ これらのことは *Mtg1* がミトコンドリアリボソームの大サブユニットの生合成に関与していると考えても矛盾はないことである。

ヒトの *Mtg1* も免疫染色法により、ミトコンドリアに局在することがわかっている。²¹⁾ また、酵母の *mtg1* 欠損による呼吸欠損を相補できることから、ヒトの *Mtg1* もミトコンドリアリボソームの生合成に関与していると考えられる。²¹⁾

1-6. 本研究の目的

1-3 項で述べたように、近年、哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成因子の解析が進んできている。しかし、完全な理解までにはまだ不十分である。1-4 項、1-5 項で述べたように *ObgH1* や *Mtg1* は哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成に関わっている可能性が高い。そこで、本研究では *ObgH1* と *Mtg1* の哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成における機能の解析を行うことで、哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成機構に関する知見を得ることを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

ヒト培養細胞は 10% FBS, penicillin(100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml)を加えた D-MEM 中で 37°C、5% CO₂ 条件で培養した。

2-2. ヒト培養細胞からのミトコンドリアの調製

回収した細胞を冷たい PBS(-)で洗い、 5×10^7 cells /ml となるように MSED(+) buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 % BSA, 0.2 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, Protease inhibitor (Roche,EDTA-free))に懸濁した。細胞懸濁液を nitrogen cavitation bomb (Parr Instrument Co., Moline,IL,USA)を用いて破碎した(5 ml ずつ、225 p.s.i.、30 min)。サンプルを遠心(1,000 × g (TOMY GRX-220), 5 min, 4 °C)して核やデブリを除き、上清を回収した(= sup1)。ペレットは 5 ml の 1×MSED(+) buffer で懸濁した。この時、18G 針を用いてサンプルを 3 往復させた。これを遠心(1,000 × g (TOMY GRX-220), 10 min, 4 °C)して、上清を回収した(= sup2)。Sup1 と 2 をまとめて遠心(800 × g (TOMY GRX-220), 20 min, 4 °C)し、上清を回収した。サンプルを遠心(3,000 × g (TOMY GRX-220), 30 min, 4 °C)し、ペレットを回収した。(上清は細胞質画分として回収した。) ペレットを 5ml の MSED(+) buffer に懸濁し蛋白定量を行った。サンプルを遠心(3,000 × g (TOMY GRX-220), 30 min, 4 °C)し、ペレット(= ミトコンドリア)を回収した。

2-3. ミトコンドリアの細分画

2-3-1. ミトコンドリアの細分画-1

まずミトコンドリアをミトプラスト(ミトコンドリアの外膜を壊した状態のもの)と外膜・膜間領域画分に分画した。10 mg のミトコンドリアを 500 µg/ml となるように

swelling buffer (10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH7.4))で懸濁し、氷上で穏やかに 20 分間混ぜた。等量の shrinking buffer (10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH7.4), 10 mM MgCl_2 , 32 % (w/v) sucrose 30% (v/v) glycerol)を加え、氷上で穏やかに 20 分間混ぜた。遠心 ($\sim 10,000 \times g$ (TOMY GRX-220), 1 h, 4 °C)し、pellet はミトプラスト、sup は外膜・膜間領域画分として回収した。

2-3-2. ミトコンドリアの細分画-2

ミトプラストをマトリクス画分と内膜画分に分画した。mitoplast を MSED(-) (20 mM HEPES-KOH (pH7.4), 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 1mM EDTA)で wash し、遠心 ($\sim 10,000 \times g$ (TOMY GRX-220), 30 min, 4 °C)した (2 回繰り返す)。pellet を 500 μl の MSED(-)で懸濁し、超音波破碎を行った(極細 tip, 10 watt, 2 秒 on 2 秒 off, total 3 min)。サンプルを遠心($150,000 \times g$, 1 h (65 krpm, TLA100.2))した。sup はマトリクス画分として回収。pellet は MSED(-)で rinse し、150 μl の RIPA (25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA , 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chymostatin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin A, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain)に懸濁して、内膜画分として回収した。

2-3-3. ミトコンドリアの細分画-3

外膜画分と膜間領域画分を分離した。2-3-1 項で得られた外膜・膜間領域画分のサンプルを遠心($150,000 \times g$, 1 h (35 krpm, SW41Ti)して pellet は 150 μl RIPA で懸濁して、外膜画分として回収した。sup には Triton-X100 を 0.1 % (v/v)になるように添加し、1 ml くらいまで濃縮(Millipore, 10 kDa cut off)した。そこに 1.0 ml PBS(+0.1 % [v/v] Triton-X100, 5 % glycerol [v/v])を添加し 1 ml まで濃縮した($\times 4$)。0.25 ml まで濃縮し、膜間領域画分として回収した。

2-4. Proteinase K assay

ミトコンドリアとミトプラストを MSED(-) buffer で懸濁し、Proteinase K (TAKARA) を最終濃度 0、0.2、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた。これらのサンプルを氷上で 30 分間反応させた。phenylmethylsulfonyl fluoride と LiDS sample buffer (40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % (w/v) LiDS, 10 % (v/v) glycerol, 10 % (w/v) bromphenol blue, 350 mM β -mercaptoethanol)を加え、反応を止めた。サンプルは 95 $^{\circ}\text{C}$ で 5 min インキュベートし、氷上においた後、SDS-PAGE を行い、immunoblotting 法により解析した。

2-5. ObgH1、Mtg1 の発現と精製

ObgH1 (31~406 amino acids) をコードした DNA fragment を京都大学大学院生命科学科の竹安邦夫教授に供与していただいた ObgH1/pGEX5X-3 を鋳型にした PCR により増幅し、pET15b (Novagen)に挿入した。図 24 の実験のみ 72~406 amino acids の ObgH1 を使用した。Mtg1 (27~334 amino acids)をコードした DNA fragment は HeLa 細胞由来の poly(A) RNA を用いた逆転写 PCR 法によって増幅し、pET15b に挿入した。

ObgH1/pET15b と Mtg1/pET15b により *E. coli* Rosetta (DE3) /pLysS (Novagen)を形質転換した。蛋白質発現は 0.1 mM isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside (IPTG)により誘導し、18 $^{\circ}\text{C}$ 、overnight で発現させた。菌体を Buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 10 % Glycerol, 3.5 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, 20 μM GDP)で懸濁し、超音波破碎により菌体を破碎した。細胞破碎液を遠心(10,000 \times g, 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$)し、上清を回収し、Ni-NTA column chromatography (QIAGEN)にロードした。Elute Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM KCl, 150 mM Imidazole, 10 % Glycerol, 3.5 mM β -mercaptoethanol, 20 μM GDP)により溶出し、透析 Buffer 1(20 mM Hepes-KOH (pH 7.5)、100 mM KCl, 10 % Glycerol, 7 mM β -mercaptoethanol, 20 μM GDP)により透析した。次に HiTrap SP HP column chromatography (GE Healthcare)を用いて KCL の濃度勾配 (0.1 ~ 0.3 mM)を利用して精製した。ObgH1、Mtg1 を含む画分を回収し、透析 Buffer 2 (20 mM Hepes-KOH (pH 7.5)、200 mM KCl, 10 % Glycerol、

7 mM β -mercaptoethanol、20 μ M GDP)で透析し、-80°Cで保存した。

2-6. ミトコンドリアリボソームの調製

ブタ肝臓のミトコンドリアリボソームはヒトミトコンドリアリボソームとホモロジーが高く、大量調整が簡便であるために、本研究ではヒトミトコンドリアリボソームのモデルとしてブタ肝臓のミトコンドリアリボソームを用いた。55S リボソームの調製は以前の方法^{40), 41)} に倣い、調製した。

2-6-1. ブタ肝臓からミトプラストの調製

ブタ肝臓を 2-3 cm 四方に刻み、0.5 kg ずつ量り取り、0.25 M Sucrose で二回リンスしたあと、ミンチ器にかけた。0.5 kg の肝臓あたり、1L の IM buffer (2 mM Hepes-KOH(pH 7.5)、70 mM Sucrose、0.22 M mannitol、0.9 mM EDTA)を加え、ダウンス式ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジェネートを遠心(500 x g, 25min, 4°C)し、上清を回収した。上清を再び遠心(5,000 x g, 25min, 4°C)し、ペレットを回収した。4kg の肝臓分のペレットを 5L の IM Buffer で懸濁し、ワーリングブレンダーにより細かく砕いた。サンプルを遠心(500 x g, 15min, 4°C)し、上清を回収した。上清を再び遠心(5,000 x g, 25min, 4°C)し、ペレットを回収した。ペレットを 3L の IM Buffer に懸濁し、ワーリングブレンダーで細かく砕き、IM Buffer を加えて 4L にメスアップした。スターラーで攪拌しながら冷えた Digitonin 溶液(200 mg/kg liver)を加え、15min 攪拌した。IM Buffer を加えて 6 L にメスアップした。サンプルを遠心(5,000 x g, 25min, 4°C)し、ペレットを回収し、再びペレットを 3L の IM Buffer に懸濁して遠心(5,000 x g, 25min, 4°C)し、ペレットを回収した。ペレットを 600 ml の IM Buffer(+PMSF, 最終濃度 0.1mM)に懸濁し、遠心(9,300 x g, 30min, 4°C)、ペレット(=ミトプラスト)を回収した。

2-6-2. ミトプラストからクルードリボソームの調製

30 g のミトプラストをホモジナイザーで 0.1 g/ml になるように Extraction Buffer (0.26 M Sucrose、40 mM KCl、15 mM MgCl₂、15 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.8 mM EDTA、

1.6 % Triton X-100、6 mM β -mercaptoethanol、0.05 mM Seprmine、0.05 mM Spermidine、0.1 mM PMSF)に懸濁し、4°Cで15分攪拌したあと、遠心(45Ti (Beckman Coulter)、21,000 rpm、30 min、4°C)した。上清(=S30)を回収し、KClを最終濃度300mMとなるよう加え、4°Cで攪拌した。45Ti遠心チューブに11mlずつSucrose Cushion Buffer(1 M Sucrose、100 mM KCl、20 mM MgCl₂、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 % Triton X-100、6 mM β -mercaptoethanol)を入れ、その上にS30を重層し、遠心(45Ti (Beckman Coulter)、35,000 rpm、22~30 hr、4°C)した。ペレットを遠心チューブ1本につき100-200 μ lのBase Buffer(20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM MgCl₂、80 mM KCl、6 mM β -mercaptoethanol)に懸濁し、4°Cで1時間震盪した。懸濁したサンプルを遠心(13,000 x g、5min、4°C)し、上清を回収した。ペレットをBase Bufferに再び懸濁してから遠心し、上清をあわせ、KCl濃度を200mMにした20 mlのBase Bufferに加えた。45Ti用遠心チューブに20 mlのTritonX-100を含まないSucrose Cushion Bufferを入れ、サンプルを重層し、(45Ti (Beckman Coulter)、35,000 rpm、20 hr、4°C)した。ペレットを回収し、遠心チューブ1本につき100-200 μ lのre-association buffer (15 mM Tris-HCl (pH 8.0)、20 mM MgCl₂、40 mM KCl、6 mM β -mercaptoethanol)を加え、4°Cで1時間震盪してペレットを溶かした。サンプルを遠心(13,000 x g、5min、4°C)し、上清を回収した。ペレットを少量のre-association bufferで再懸濁し、ペレットが透明なデブリのみになるまで遠心(13,000 x g、5min、4°C)を繰り返した。得られた上清を合わせ、ミトコンドリアクルードリボソームとして回収した。

2-6-3. クルードリボソームから55Sミトコンドリアリボソームの調製

ミトコンドリアクルードリボソーム(max.600 μ l、70 A₂₆₀/grad)を6-38% (w/v) Sucrose Gradient/re-association Bufferに重層し、遠心(SW28 (Beckman Coulter)、20,000 rpm、16 hr、4°C)し、density gradient fractionators (Towa Labo, Model 152-001)で回収した。55S mt ribosomeのフラクションを回収し、Sucroseを含まないre-association bufferで45Ti用遠心チューブの肩までメスアップし、遠心(45Ti (Beckman Coulter)、23,000 rpm、27 hr、4°C)し、ペレットを回収した。ペレットを各チューブ100 μ lのsucroseを含まないre-association bufferに懸濁し、4°Cで1時間震盪した。サンプルを遠心(13,000 x g、5min、4°C)し、上清を回収した。ペレットを少量のsucroseを含まないre-association bufferで再懸濁し、遠心(13,000 x g、5min、4°C)し、得られた上清を上記の上清とあわせ、55Sミトコンドリアリボソームを回収した。

2-6-4. 28S 小サブユニット、39S 大サブユニットの調製

精製した 55S リボソームを dissociation buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM MgCl₂、200 mM KCl、6 mM β-mercaptoethanol)中で 28S 小サブユニットと 39S 大サブユニットに解離させた。このサンプルをショ糖密度勾配にかけ(SW28 (Beckman Coulter)、20,000 rpm、16 hr、4°C)、28S と 39S のフラクションを回収し、遠心(70Ti (Beckman Coulter)、40,000 rpm、6hr、4°C)し、ペレットを回収した。ペレットを re-association buffer に懸濁した。

2-7. *E. coli* リボソームの調製

E. coli 由来の 70S リボソームは本研究室で開発された PURE system で用いている 70S リボソーム⁴²⁾を使用した。*E. coli* のリボソームのサブユニット(50S と 30S) については 70S リボソームを低 Mg²⁺濃度条件でサブユニットに解離させ、ショ糖密度勾配遠心により調製したものをを使用した。

2-8. Ribosome-binding assay

0.2 μM 55S ribosome と 2 μM ObgH1/Mtg1 を 100 μl の binding buffer (15 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 mM guanine nucleotide) 中で反応させた。室温、20 分の反応後、15-30 % (w/v)のショ糖密度勾配に重層し、遠心 (SW41Ti (Beckman Coulter)、39,000 rpm、5.5 h) した。遠心後、density gradient fractionators (Towa Labo, Model 152-001)を用いて、260 nm の吸光を測定しながら分画した。*E. coli* の 70S リボソームとの結合実験では、0.2 μM 70S ribosome と 2 μM ObgH1/Mtg1 を 100 μl の binding buffer (15 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 mM guanine nucleotide)中で反応させた。室温、20 分の反応後、15-30 % (w/v)のショ糖密度勾配に重層し、遠心 (SW41Ti (Beckman Coulter)、39,000 rpm、4 h) した。*In vivo* でのミトコンドリアリボソームと ObgH1、Mtg1 の結合の解析のためには、精製したミトコンドリアを extraction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NH₄Cl、10 mM Mg(OAc)₂、2 % NP-40、7 mM β-mercaptoethanol、1 mM PMSF、80 U/ml

HPR I) (GDPNP を加えるときは 2 mM の濃度で加えた) で溶解し、10-30 % (w/v) のシヨ糖密度勾配に重層し、遠心 (SW41Ti (Beckman Coulter), 135,000 × g (33,000 rpm), 7 h) した。フラクションは SDS-PAGE の後、immunoblot により解析した。

2-9. Double stranded RNA (dsRNA) transfection

次に示す dsRNA を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて HeLa 細胞にトランスフェクションした。ObgH1 をノックダウンするための dsRNA の sense 鎖の配列は 5'-GCAACGGUGGACACGUCAU-3'、antisense 鎖の配列は 5'-AUGACGUGUCCACCGUUGCCU-3' である。Mtg1 をノックダウンするための dsRNA の sense 鎖の配列は 5'-GUUAAAGGGCUGUUUCUU-3'、antisense 鎖の配列は 5'-AAGAAACAGGCCCUUUAACUG-3') である。RNAi 実験において control として Firefly Luciferase をノックダウンするための dsRNA を用いた。この dsRNA の sense 鎖は 5'-GUGCGCUGCUGGUGCCAAC-3'、antisense 5'-GUUGGCACCAGCAGCGCACUU-3') である。ミトコンドリアのリボソーム蛋白質の量や呼吸鎖複合体の形成の解析の時には、3 日後に再びトランスフェクションを行った。はじめのトランスフェクションから 5 日後に細胞を回収し解析に進んだ。ミトコンドリアの翻訳活性解析やミトコンドリアリボソーム RNA の解析の時には、4 日後に 2 回目のトランスフェクションを行った。1 回目のトランスフェクションから 7 日後にミトコンドリアの翻訳解析や RNA の調製に進んだ。

2-10. Mitochondrial translation assay (パルスラベル法)

RNAi 処理した細胞を wash medium (10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 0.5% PS, 100 μM Cys in DMEM(-Met)) で洗浄し、pre-incubate medium (10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 0.5 % PS, 100 μM Cys, 2 % FBS, 2 mM Glutamine, 0.2 mg/ml Emetine in DMEM(-Met)) を入れ、37 °C, 15 min, 5 % CO₂ でインキュベートした。Pre-incubate medium を取り除き、incubate medium (10 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 μM Cys, 2% FBS, 2mM Glutamine, 0.2 mg/ml Emetine, 0.2 mCi/dish ³⁵S-Met in DMEM (-Met)) を加え、37 °C, 2

h, 5 % CO₂でインキュベートした。ラベルした後、細胞を回収し 1 % [v/v] Triton X-100 を含む PBS で細胞を溶解し、10,000 x g, 5 min 遠心することで不溶性のものを取り除いた。上清を 15 % SDS-PAGE により分離して、Coomassie Brilliant Blue (CBB)で染色したあと、BAS5000 (Fujifilm)により、放射性のバンドを検出した。

2-11. RNA isolation and northern blotting

HeLa 細胞から ISOGEN (ニッポンジーン)を用いて total RNA を分離した。Northern blotting のために、total RNA を変性 1%アガロースで電気泳動し、Hybond-NX membrane (GE Healthcare)に転写した。放射ラベルされたプローブは $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてオリゴ DNA (5'-cttctattgacttgggtaaatcgtgtgacc-3' for 12S mt rRNA, 5'-atcttgacaac cagctatcaccaggctcg-3' for 16S mt rRNA)をリン酸化して作った。

2-12. Blue native PAGE

RNAi 処理した HeLa 細胞を回収し、蛋白濃度が 5 mg/ml となるように PBS で再懸濁した。細胞懸濁液と同量の 4 mg/ml digitonin (in PBS)を混ぜ合わせ、氷上で 15 分インキュベートした。サンプルを 10,000 x g, 10 min, 4 °Cで遠心し、ミトコンドリアが濃縮された pellet を PBS で 2 回 wash した。Pellet を Solubilization buffer (50 mM NaCl, 5 mM 6-aminohexanoic acid, 50 mM imidazole, 10 % glycerol, 1 % digitonin)で懸濁し、氷上で 15 分インキュベートすることで可溶化した。可溶化サンプルを遠心 (20,000 x g, 20 min) して、上清を NativePAGE Novex 3-12 % Bis-Tris Gel (Invitrogen)で Blue-Native gel 電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを denaturing buffer (20 mM Tris-HCl [pH 6.8], 1 % SDS, 100 mM β -mercaptoethanol)中で 60°C、15 分インキュベートし、蛋白質を PVDF 膜にトランスファーし immunoblot 解析を行った。

2-13. GTPase 活性の測定

基本的な GTPase 活性測定では、GTPase assay buffer(20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM KCl, 4.5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 2 mM spermidine, and 0.05 mM spermine) 25 μ l 中でリボソームと因子を反応させる。反応は 7.5 mM γ -[³²P]GTP (~50 cpm/pmol)を 0.5 μ l 加えることを開始させた。30°Cで 20 分反応させた後、100 μ l の 0.1 N H₂SO₄-1.5 mM NaH₂PO₄ と 25 μ l の 5 % sodium molybdate. Phosphomolybdate を加えて反応を止めた。Phosphomolybdate complexes を 250 μ l の n-butanol で抽出し、butanol 層 200 μ l に含まれる放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。*E. coli* のリボソーム依存的な GTPase 活性の測定では、0.2 μ M の *E. coli* のリボソーム (70S リボソーム、50S 大サブユニット、30S 小サブユニット)と 4 μ M の ObgH1、Mtg1 とを反応させた。ミトコンドリアリボソームのサブユニットを用いた実験では、0.2 μ M のミトコンドリアリボソーム (55S リボソーム、39S 大サブユニット、28S 小サブユニット)と 10 μ M の Mtg1 を反応させた。Mtg1 の量を変える実験では、0.2 μ M の 55S リボソームと Mtg1(0、0.5、1、2、4、8 μ M)を反応させた。反応速度定数を求める実験では、0.2 μ M の 55S リボソームと 10 μ M Mtg1 と GTP (0、9.375、18.75、37.5、75、150 μ M)を加えて反応させた。

2-14. クロスリンク実験

Sulfo-MBS はチオール基との反応性を持つので、Sulfo-MBS を用いたクロスリンクの実験の場合、還元剤として β -mercaptoethanol と DTT を使うことができない。そこで、チオール基を持たない還元剤である tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)入りの buffer に 39S 大サブユニットと Mtg1 が溶けている buffer を交換した。0.2 μ M の 39S 大サブユニットと 2 μ M の Mtg1 を 100 μ l の crosslink Buffer 1(20 mM Hepes-KOH (pH 7.5)、2 mM MgCl₂、100 mM KCl、1 mM TCEP、2 mM GDPNP)中で反応させた (20 min、室温)。その後、Sulfo-MBS (f.c. 0.1 mM)を加えて 37 °Cで 1 h クロスリンク反応を行った。Tris-HCl (pH 7.5) (f.c. 20 mM)と β -mercaptoethanol (f.c. 20 mM)を加えて、37 °Cで 10 min インキュベートし、クロスリンク反応を停止させた。サンプルを 30 % (w/v) Sucrose Cushion Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、50 mM KCl、5 mM MgCl₂、1 mM

TCEP)に重層し、遠心 (70Ti (Beckman Coulter)、42,000 rpm、13 h) した。56 μ l の 1 % SDS で懸濁し、98 $^{\circ}$ C で 2 min ボイルした。その後、crosslink Buffer 2 (20 mM KPi (pH 7.4)、300 mM NaCl、20 mM imidazole (pH 7.4)、0.1 % DDM)で 400 μ l にメスアップした。crosslink Buffer 2 で平衡化した MgneHis (Promega) 2 μ l 分を加えて、2h、4 $^{\circ}$ C で反応させた。crosslink Buffer 2 で wash を行ったあと、Sample Buffer Solution (2ME+) (Wako)に 500 mM imidazole を添加したものを 8 μ l で溶出した。100 pmol 分 (上の 5 倍) の 39S リボソームを用いて溶出されてきたもの全てを 10 % SDS-PAGE で分離し、Quick-CBB PLUS (Wako)で染色した。クロスリンクされたもののバンドの位置のゲルを切り取り、Genomine 社に依頼して LC/MSMS により蛋白質を同定した。

2-15. C10orf46 安定発現株の作製

C10orf46 安定発現株の作製にあたり、まず Flp-in system (invitrogen)を組み込んだ HeLa 細胞を作製した。Hela 細胞に pFRT/lacZeo をトランスフェクションし、100 μ g/ml Zeocin でセレクションし、クローニングを行った。 β -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega)を用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性が一番高いクローン(Flp-in HeLa 細胞)を採用した。C10orf46-myc/pcDNA 5.0/FRT (Life Technologies に合成遺伝子を注文)と pOG44 (invitrogen)を Flp-in HeLa 細胞にトランスフェクションした。200 μ g/ml の Hygromycin B でセレクションし、クローニングを行い、細胞抽出液を myc 抗体でウエスタンブロッティングすることで C10orf46 の発現を確認した。

2-16. Bi-molecular fluorescent complementation 実験

まず、HeLa 細胞由来の poly(A) RNA を用いた逆転写 PCR によって調製した cDNA から Mtg1 の ORF 全長を増幅し、pcDNA 3.1 Zeo(+)に組み込み Mtg1/pcDNA 3.1 Zeo(+)を作製した。Venus の N 末側半分(V_N)と C 末側半分(V_C)の配列は Bi-molecular fluorescent complementation 実験⁴³⁾用のベクターである pBiFC-VN173 と pBiFC-VC155 (addgene)を鋳型にした PCR で増幅し、Mtg1/pcDNA 3.1 Zeo(+), C10orf46-myc/pcDNA 5.0/FRT に組み込み、Mtg1- V_N /pcDNA 3.1 Zeo(+),

Mtg1-Vc/pcDNA 3.1 Zeo(+), C10orf46-myc-V_N /pcDNA 5.0/FRT, C10orf46-myc-V_C /pcDNA 5.0/FRT を作製した。

共焦点顕微鏡観察をするために、HeLa 細胞を 4 well の LAB-TEK CHAMBERED COVERGLASS (nunc) に 1×10^4 cells/well でまいた。次の日、V_N、V_C を含むプラスミドをそれぞれ 125 μ g ずつトランスフェクションした。トランスフェクションしてから 3 日後に、100 nM の Mito Tracker Red (Molecular Probes) と 1 μ g/ml の Hoechst 33342 (Molecular Probes) を含む培地で培養 (10 min、室温) し、染色反応をした。PBS で wash したあと、共焦点顕微鏡により観察した。

2-17. 本研究で用いた抗体

抗 ObgH1 抗体 (affinity 精製)、抗 Mtg1 抗体 (affinity 精製)、MRPL7/L12 抗体 (血清)、MRPS12 抗体 (血清) は本研究室で作製した。抗-Complex I 39kDa subunit 抗体、抗 Complex II 70kDa subunit 抗体、抗 Complex III subunit Core 1 抗体、抗 Complex IV subunit I 抗体、抗 Complex IV subunit II 抗体、抗 Complex IV subunit IV 抗体、抗 Complex V a subunit 抗体は Molecular Probes から購入した。抗 Porin 抗体は Calbiochem から購入した。抗 cyt C 抗体は BioVision から購入した。抗 Hsp60 抗体は Sigma から購入した。抗 Tom40 抗体、抗 ATP8 抗体は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 Tom20 抗体、抗 MRPS29 抗体は BD Bioscience から購入した。抗 MRPL45 抗体は Abcam から購入した。抗 EF-Tu/Tsmt は University of North Carolina の Linda Spremulli 教授からご供与して頂いた。

2-18. 抗体の精製

抗 ObgH1 血清と抗 Mtg1 血清を用いた細胞の抽出液に対するウエスタンブロッティングでは非特異バンドが多かったので、抗血清を affinity 精製することにした。200 μ l の NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) を antibody purified Buffer (20 mM HEPES-KOH (pH7.5)、100 mM KCl) で平衡化したあと、500 μ g の recombinant

ObgH1 または Mtg1 を加え、4 °C、overnight で樹脂に結合させた。0.5 M Tris-HCl (pH 8.0) 1.5 ml を加え、2 時間、室温でインキュベートし、反応を止めた。その後、50 mM Tris-HCl (pH8.5) 1.5 ml で wash し、50 mM KOAc (pH 3.5) 1.5 ml で wash した(x 4 回)。樹脂を PBS で平衡化した後、2 ml の抗血清を加えて 2 時間室温でインキュベートした。樹脂を 4 ml の PBS で 4 回 wash したあと、0.1 M glycine-HCl (pH 2.5) を 4 回加え、抗体を溶出した。溶出した抗体 800 ml に 500 ml の 0.5 M Tris-HCl (pH 8.5) を直ちに加えて、10 % (v/v) glycerol を含む PBS で透析した。

3. 結果

3-1. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリア内局在

これまでの免疫染色法による解析により、ヒト培養細胞において ObgH1 や Mtg1 はミトコンドリアに局在することが知られている。^{21), 30)} そこで、まず、ObgH1 や Mtg1 のミトコンドリア内での局在について調べた。ヒト培養細胞からミトコンドリアを調製し、外膜、膜間、内膜、マトリクスの4つに分画した。それぞれのフラクションについてウエスタンブロッティングを行うことで ObgH1、Mtg1 の局在を調べた。その結果、ObgH1、Mtg1 ともに内膜のフラクションに検出された (図7)。ObgH1、Mtg1 は膜貫通ドメインを持っていないので内膜と相互作用する蛋白質であると考えられる。

ミトコンドリアの分画の実験では内膜との相互作用が膜間側からなのか、マトリクス側からなのかを区別することができない。そこで、次に内膜との相互作用が膜間側からかマトリクス側からかを調べるために、proteinase K アッセイを行った。Proteinase K アッセイではミトコンドリアと外膜を壊したミトプラストに対して proteinase K を反応させる。0.2 µg/ml の Proteinase K は膜を透過することはできないので膜よりよりも外側にあるものが分解される。外膜より外側にあるものはミトコンドリアでも分解を受け、膜間領域にあるものはミトコンドリアでは分解されないが、ミトプラストでは分解を受ける。また、マトリクス領域にあるものはミトコンドリアでもミトプラストでも分解されない。図8に示すように、マトリクスの蛋白質である Hsp60 はミトプラストにおいても分解されない。ミトコンドリアの外膜蛋白質で膜間領域に露出した領域を持つ Tom40 はミトコンドリアでは分解されないが、ミトプラストにおいて分解される。外膜蛋白質で細胞質に露出した領域を持つ Tom20 はミトコンドリアにおいても分解される。ObgH1、Mtg1 に関しては0.2 µg/ml の proteinase K 濃度においてミトコンドリアやミトプラストのどちらでも切断されずに残っていることがわかった (図8)。この結果より ObgH1 や Mtg1 は内膜よりも内側に存在していることがわかった。ミトコンドリアの分画の実験結果と合わせて考えると ObgH1 や Mtg1 はミトコンドリアのマトリクス側から内膜と相互作用していることがわかった。

3-2. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリアリボソームとの相互作用

ObgH1、Mtg1 はそれぞれ Obg family、YlqF/YawG family に属している。バクテリアの Obg は GTP 依存的に 50S 大サブユニットと相互作用することが知られている。^{31), 32), 44)} また、酵母の Obg family 蛋白質でミトコンドリアに局在する Mtg2 もリボソームの大サブユニットに結合することが知られている。²²⁾ バクテリアの YlqF もまた GTP 依存的にリボソームの大サブユニットに結合すると報告されているが、^{35), 39)} 酵母のミトコンドリアに局在する YlqF/YawG family 蛋白質である Mtg1 はリボソームと相互作用しないと報告されている。²¹⁾

ヒトのミトコンドリアに局在する ObgH1 や Mtg1 がミトコンドリアのリボソームと相互作用するかを recombinant の蛋白質を用いた系とミトコンドリア抽出液を用いた系で解析した。図 9 では、ブタの肝臓から調製したミトコンドリアリボソームと recombinant の ObgH1 や Mtg1 を様々な種類のグアニンヌクレオチドの存在下で反応させた。反応サンプルをショ糖密度勾配により分画し、それぞれのフラクションについてウエスタンブロッティングにより ObgH1、Mtg1 を検出した。その結果、ObgH1 は GTP や GDPNP (GTP の非加水分解アナログ) の存在下で 39S 大サブユニットに結合していた。GDP 存在下では 39S 大サブユニットと結合しないことから、ObgH1 は GTP 型で大サブユニットと相互作用することがわかった。Mtg1 は GDPNP 存在下でのみ大サブユニットと相互作用しており、GTP や GDP 存在下ではリボソームとの結合は検出できなかった。バクテリアの YlqF でも同様に GTP の非加水分解アナログである GTP γ S 存在下でのみリボソームと相互作用しており、GTP の場合にはリボソームに結合すると速やかに GTP の加水分解をおこし、リボソームから解離すると考えられている。これらより、Mtg1 も GTP 型でリボソームに結合し、GTP の加水分解とともにリボソームから解離しているのではないかと考えられる。また、ObgH1 も Mtg1 も 55S リボソームには結合しないことがわかった。

本研究で用いているミトコンドリアのリボソームはブタの肝臓から遠心分離によって調製している。そのため、ミトコンドリアリボソームを調製するときミトコンドリアリボソーム以外の大きな複合体が混入してくる可能性も考えられる。そこで図 9 の実験における ObgH1 や Mtg1 のシグナルがリボソームとの結合によるものかを確認するために、*E. coli* のリボソームを用いた実験を行った。図 9 の実験と同様に、*E. coli* の 70S

と recombinant の ObgH1 または Mtg1 を GDPNP 存在下で混合し、シヨ糖密度勾配により分画した後にウエスタンブロッティングにより ObgH1 と Mtg1 を検出した。その結果、図 10 に示すように ObgH1 も Mtg1 も GDPNP 存在下で *E. coli* のリボソームの大サブユニットに結合していることがわかった。よって、図 9 における 39S 大サブユニットのフラクションの ObgH1、Mtg1 のシグナルはリボソームとの結合によるものであると示唆された。

次にミトコンドリアの抽出液を用いた実験において、endogenous な ObgH1、Mtg1 がミトコンドリアリボソームと結合するのかを解析した。ミトコンドリアの抽出液をシヨ糖密度勾配により分画し、それぞれのフラクションについてウエスタンブロッティングにより ObgH1、Mtg1 を検出した。その結果、endogenous な ObgH1 は図 9 の実験結果と同様に 39S 大サブユニットと結合していることがわかった(図 11)。それに対し、endogenous な Mtg1 はリボソームとは結合しておらず、top fraction に存在していることがわかった。図 9 の実験より、Mtg1 は GDPNP 存在下でのみ 39S リボソームと相互作用することがわかっている。また、*B. subtilis* では細胞抽出液をシヨ糖密度勾配により分画すると、GTP γ S 存在下のみで YlqF はリボソームの大サブユニットに結合し、GTP や GDP 存在下では結合しないことが報告されている。³⁵⁾ そこでミトコンドリアの抽出液を用いた実験でも GDPNP を加えることで結合するのではないかと考え、検証した。ミトコンドリアの抽出液を調製するとき GDPNP 存在下で調製し、図 11 の実験と同様に実験を行った。その結果、図 12 に示すように 39S リボソームに結合する Mtg1 を検出することができた。また、これまで酵母の Mtg1 とミトコンドリアのリボソームと相互作用しないと言われていた。²¹⁾ その実験ではグアニンヌクレオチドを加えておらず、そのためにリボソームとの結合が検出できなかったと考えられる。

3-3. ObgH1、Mtg1 をノックダウンした時に与える影響

Obg ファミリー蛋白質や YlqF/YawG ファミリー蛋白質はリボソームの大サブユニットと相互作用し、リボソームの生合成の後期に関与していると言われていた。^{32), 35), 37), 38)} そこでミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアリボソームの大サブユニットと相互作用する ObgH1 や Mtg1 はミトコンドリアのリボソームの生合成に関与しているのではないかと考えた。もし、ObgH1 や Mtg1 がミトコンドリアリボソームの生合成に関与

するのであれば、ObgH1 や Mtg1 をノックダウンするとミトコンドリアリボソームの生合成が異常になり、ミトコンドリアの翻訳活性やミトコンドリアの翻訳産物を必要とする呼吸鎖複合体に影響が出ると考えられる。そこで ObgH1 や Mtg1 をノックダウンした時のミトコンドリアリボソームに与える影響、ミトコンドリアの翻訳活性に与える影響、呼吸鎖複合体に与える影響について解析した。HeLa 細胞を dsRNA で処理してから5日後には、ObgH1 や Mtg1 の蛋白量は control の細胞と比べて、それぞれ約 15 %、10 %になっていた(図 14)。

3-3-1. ミトコンドリア rRNA とリボソーム蛋白質の解析

リボソームの生合成が異常になると rRNA の分解やプロセシング異常による前駆体の蓄積が起きることが多い。*E. coli* の Obg を欠損させると、大、小サブユニットの rRNA である 16S、23S rRNA の前駆体が蓄積することが知られている。^{31), 32)} また酵母のミトコンドリアの Mtg1 を欠損させると rRNA の分解が起きることが知られている。²¹⁾ そこで、ObgH1 や Mtg1 をノックダウンした時にミトコンドリアの rRNA に影響が出るのかを調べるために、細胞内のミトコンドリアの rRNA について解析を行った。dsRNA によって ObgH1 や Mtg1 をノックダウンしてから7日後の HeLa 細胞から total RNA を抽出し、ノーザンブロットィングにより解析を行った。その結果、図 13 に示すようにミトコンドリアの rRNA (12S と 16S)の量に影響はなかった。また、rRNA の前駆体の蓄積も検出されなかった。

次にミトコンドリアのリボソーム蛋白質について解析した。dsRNA により ObgH1、Mtg1 をノックダウンしてから5日後の HeLa 細胞を回収した。細胞の抽出液を調製し、細胞内でのミトコンドリアのリボソーム蛋白質の細胞内での量について、ウエスタンブロットィングにより解析した。その結果、図 14 に示すように解析したリボソーム蛋白質(L7/L12、L45、S12 と S29)の蛋白量に大きな変化はなかった。

3-3-2. ミトコンドリアの翻訳活性の解析

次にミトコンドリアの翻訳活性について解析を行った。酵母ミトコンドリアの Obgファミリー蛋白質である Mtg2 の温度感受性株においては、非許容温度にするとミトコンドリアの翻訳パターンが変化する。²²⁾ COI、COIII、Cytb の翻訳量は減少するが、COII の翻訳量は増加することが知られている。²²⁾ 酵母ミトコンドリアの YlqF/YawG family 蛋白質である Mtg1 の温度感受性株では、非許容温度にするとミトコンドリアの翻訳活性が全体的に低下することが知られている。²¹⁾ そこでヒトの ObgH1 や Mtg1 のノックダウンがミトコンドリアの翻訳活性に与える影響を解析するために、パルスラベル実験を行った。dsRNA 処理をしてから7日後の HeLa 細胞を細胞質の翻訳阻害剤である emetine 存在下で培養することで、細胞質での翻訳を止め、その後、^[35S]-methionine 入りの培地中で培養し、新たにミトコンドリアで合成された蛋白質のみを2時間ラベルした。ラベルされたミトコンドリアでの翻訳産物をオートラジオグラフィにより検出することで、翻訳活性を解析した。その結果、図 15 に示すように ObgH1 をノックダウンすると、ミトコンドリアでの翻訳のパターンが変わることがわかった。ほとんどの蛋白質の翻訳に関しては大きな変化はなかったが、complex V のサブユニットである ATP6、ATP8 の翻訳量が約 1.5 倍になっていた。酵母ミトコンドリアの Mtg2 の温度感受性株で上昇が見られた COII の翻訳量はそれほど大きな変化はなかった。また、酵母ミトコンドリアの Mtg2 の温度感受性株では ATP6 や ATP8 の翻訳活性に関しては解析しておらず、どのような影響があるかは不明である。それに対して、Mtg1 をノックダウンするとミトコンドリア全体の翻訳活性が約 60%に減少していた。これは酵母ミトコンドリアの Mtg1 の温度感受性株の場合と同様の結果である。

3-3-3. 呼吸鎖複合体のサブユニットの解析

ミトコンドリアにある呼吸鎖複合体は5個の複合体から構成されている。哺乳類ミトコンドリアで翻訳される13個の蛋白質は全て呼吸鎖複合体のサブユニットである。Complex I のサブユニットが7個、Complex III のサブユニットが1個、Complex IV のサブユニットが3個、Complex V のサブユニットが2個となっている。Complex II は核 DNA にコードされた蛋白質のみで構成されている。ミトコンドリアの翻訳活性が異

常になると呼吸鎖複合体にも影響がでると考えられる。そこで ObgH1 や Mtg1 をノックダウンした時の呼吸鎖複合体に与える影響について解析した。まず細胞内の呼吸鎖複合体のサブユニットの量について解析した。dsRNA により ObgH1 や Mtg1 をノックダウンしてから 5 日後の HeLa 細胞を回収し、細胞全体の抽出液を調製し、ウエスタンブロッティングにより呼吸鎖サブユニットの蛋白量を解析した。核 DNA にコードされている呼吸鎖複合体のサブユニットを各複合体 1 個ずつとミトコンドリアの DNA にコードされている蛋白質として Complex IV のサブユニットである COI と COII、Complex V のサブユニットである ATP8 について解析を行った。その結果、図 16 に示すように、ObgH1 をノックダウンした場合には核 DNA にコードされているサブユニットの量も、ミトコンドリアの DNA にコードされているサブユニットの量も明らかな変化はなかった。それに対して Mtg1 をノックダウンした場合には核 DNA にコードされたサブユニットはほとんど変化がなかったが、mtDNA にコードされたサブユニットの量は約 60% に減少する傾向が見て取れた。

3-3-4. 呼吸鎖複合体のアセンブリーの解析

次に、呼吸鎖複合体のアセンブリーの解析を行った。dsRNA により ObgH1 や Mtg1 をノックダウンしてから 5 日後の HeLa 細胞からミトコンドリアを回収し、Blue-Native PAGE を行った後に、核の DNA にコードされた呼吸鎖複合体のサブユニットの抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。哺乳類では Complex I、III、IV からなる supercomplex と呼ばれる大きな複合体をつくることが知られている。⁴⁵⁾ 今回の実験ではその supercomplex のバンドも確認できた。ObgH1 をノックダウンした時には、図 17 に示すように Complex I、II、III、IV のアセンブリーに影響はほとんど見られなかったが、Complex V に関してはアセンブリーの異常が見られ、成熟した Complex V の量が少し減少し、前駆体のような異常な複合体の蓄積 (図 17◎) が検出された。図 15 で示したように ObgH1 をノックダウンすると Complex V のサブユニットである ATP6、ATP8 の翻訳活性が上昇していたことと、Complex V のアセンブリーの異常は関連していると考えられる。それに対し、Mtg1 をノックダウンすると、Complex I や complex IV の形成が著しく異常になり量が減少していた。それに伴って supercomplex の量も減少していた。また、Complex V の形成も異常になり、ObgH1 のノックダウンの時と同様に異常な複合体が蓄積していた。Mtg1 をノックダウンし時にはミトコンド

リアの翻訳活性が全体的に低下していたことから、呼吸鎖複合体のアセンブリーも全体的に異常になったと考えられる。また、核の DNA のサブユニットのみで構成される Complex II に関しては、ObgH1 や Mtg1 をロックダウンしても形成に影響を与えなかった。これらのことからミトコンドリアの翻訳と呼吸鎖複合体のアセンブリーは密接に関連していると考えられる。

3-4. ObgH1、Mtg1 の GTPase 活性測定

Obg ファミリー蛋白質は低い intrinsic な GTPase 活性をもっていることが知られている。^{30), 46)} それに対し、YlqF/YawG ファミリー蛋白質はリボソーム依存的な GTPase 活性をもっていることが知られている。^{35), 38), 39)} そこでヒトの ObgH1、Mtg1 もそれぞれ Obg ファミリー蛋白質や YlqF/YawG ファミリー蛋白質と同様の GTPase 活性を持つかどうかについて解析を行った。まずは調整が容易である *E. coli* のリボソーム (70S リボソーム、50S 大サブユニット、30S 小サブユニット) を用いて解析を行った。ObgH1 や Mtg1 は *E. coli* のリボソームの 50S 大サブユニットに結合できることや ObgH1 は *E. coli* の ObgE の欠損を相補できることから *E. coli* のリボソームがミトコンドリア 55S リボソームの代わりをすることができると考えた。その結果、図 18 に示すように ObgH1 は intrinsic な GTPase をもっていることがわかったが、リボソーム依存的な GTPase 活性を検出することはできなかった。それに対して、Mtg1 は intrinsic な GTPase 活性は検出できなかったが、50S 大サブユニットがあるときには GTP を加水分解することがわかった。つまり、Mtg1 はリボソームの大サブユニット依存的な GTPase 活性をもっていることがわかった。

E. coli のリボソームを用いた実験により、Mtg1 はリボソーム依存的な GTPase 活性を持つことがわかった。そこで、Mtg1 はミトコンドリアのリボソームによっても GTPase 活性を活性化されるかを検証した。55S リボソーム、39S 大サブユニット、28S 小サブユニットを用いて GTPase 活性を測定した。その結果、図 19 に示すように *E. coli* のリボソームを用いた場合と同様に 39S 大サブユニットが存在するときに Mtg1 は GTP を加水分解することがわかった。これより Mtg1 はリボソームの 39S 大サブユニット依存的な GTPase 活性をもっていることがわかった。次に Mtg1 の GTPase 活性の Mtg1 量依存性を調べた。Mtg1 の濃度を 0 ~8 μM まで変化させ GTPase 活性を測

定した。その結果、図 20 に示すように 8 μM の Mtg1 の時にはほぼ飽和していた。この結果を受け、10 μM の Mtg1 の条件で 55S リボソーム依存的な GTPase の k_{cat} を求めることにした。その結果が図 21 であり、 $k_{\text{cat}} = 0.031 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ であった(表 4)。

3-5. Mtg1 とミトコンドリアリボソームのクロスリンク

3-2 項で述べたとおり、Mtg1 はミトコンドリアリボソームの大サブユニットと相互作用することがわかった。これまでにヒト以外の YlqF/YawG ファミリー蛋白質とリボソームの相互作用部位について解析が行われている。*B. subtilis* では YlqF はリボソーム蛋白質の L25 や大サブユニットの rRNA である 23S rRNA の Helix 38、81、85 と相互作用すると言われている。³⁵⁾ それに対し、*O. sativa* (イネ) の YlqF/YawG ファミリー蛋白質である Nug2 は L10a (バクテリアの L1 に相当) と相互作用することが知られている。⁴⁷⁾ このように YlqF/YawG ファミリー蛋白質であっても結合する部位は異なっている。さらに、ミトコンドリアのリボソームには *B. subtilis* の YlqF が相互作用する L25 や rRNA の Helix 38、85 は保存されていない。^{2), 33)} これらのことから Mtg1 がミトコンドリアリボソームの大サブユニットのどこに相互作用しているのかという疑問が生じてくる。そこで、Mtg1 とミトコンドリアリボソームの大サブユニット(39S)とをクロスリンクすることで、Mtg1 の binding partner を見つけ、Mtg1 の結合部位に関する知見を得ることにした。Gruschke, S. *et al.* (2010)⁴⁸⁾ を参考にして実験を行った。具体的な方法を図 22 に示した。まず精製した 39S リボソームと His tag 付きの Mtg1 を GDPNP 存在下で混合し、リボソームに Mtg1 を結合させたあと crosslinker である Sulfo-MBS でクロスリンクした。その後、30% の sucrose cushion に重層して超遠心を行うことでリボソームに結合した Mtg1 と free の Mtg1 とを分離した。そして、SDS によりリボソームをバラバラにしたあと Ni 精製を行うことで Mtg1 とクロスリンクされたものを回収した。回収したサンプルを SDS-PAGE した結果が図 23 である。Mtg1 単独のバンドの他に Mtg1 と何かがクロスリンクされて分子量が大きくなったと思われるバンドが確認できた。このバンドを LC/MSMS により同定した結果、C10orf46 がクロスリンクされたものであることがわかった。

3-6. C10orf46 のミトコンドリア局在の検証

Mtg1 とミトコンドリアリボソームの大サブユニットとのクロスリンク実験で Mtg1 とクロスリンクされてきたものとして C10orf46 が同定された。この C10orf46 はこれまでにミトコンドリアのリボソーム蛋白質として同定されてきたものの中には含まれていない。C10orf46 はアミノ酸数 369 個の蛋白質であり、E3 ubiquitin ligase の Cullin family に特徴的な Cullin motif を持っている。C10orf46 は S 期への移行に重要な Cyclin-dependent kinase 2 (CDK2)の活性を制御することで細胞周期に関っている蛋白質である。⁴⁹⁾ また、アルツハイマー病の患者の海馬で C10orf46 の発現量が低下しており、C10orf46 はアルツハイマー病にも関わっているのではないかとされている⁵⁰⁾ C10orf46 の細胞内局在についても調べられており、細胞周期に合わせて核と細胞質を行き来することがわかっている。⁴⁹⁾ さらにアミノ酸配列から蛋白質の細胞内局在部位を予測する WoLF PSORT を用い、C10orf46 の局在予測を行った結果は、「細胞質に局在する確率が 18.0 %、細胞質と核に存在する確率が 16.5%、核に局在する確率が 11.0%」であり、核や細胞質に局在する可能性が高いという結果を得た。つまり、ミトコンドリアに局在するという報告はひとつもない。そこで本当に C10orf46 がミトコンドリアに局在し、リボソームと相互作用するのかという疑問が生じる。クロスリンク実験で用いたミトコンドリアリボソームはブタの肝臓から遠心分離により精製したものであり、コンタミネーションがまったくないとは言い切れない。そこで Mtg1 とのクロスリンク実験が人為的結果ではないことを示すために C10orf46 がミトコンドリアにも存在することを示すことを試みた。まず、C10orf46 の C 末端に myc tag を融合した蛋白質を発現する細胞株を作製し、細胞内での発現を確認した。myc の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、二つのバンドが検出された(図 24)。C10orf46 の分子量は 41 kDa であることから、泳動度から判断して二つのバンドうち上のバンドが全長の C10orf46 であると考えられる。細胞内での発現が確認できたので、この C10orf46-myc 発現株を用いて、ミトコンドリアを調製し、ミトコンドリアを外膜、膜間、内膜、マトリクスに分画することで、C10orf46 がミトコンドリアに存在するかを解析した。その結果、図 25 に示すように C10orf46 の大部分は細胞質に存在していたが、一部の C10orf46 がミトコンドリアの内膜に存在する結果を得た。

3-7. Mtg1 と C10orf46 の相互作用の検証

C10orf46 はミトコンドリアにも存在している可能性があることがわかったので、Mtg1 と C10orf46 とのミトコンドリア内での相互作用を検証することにした。そこで BiFC (bi-molecular fluorescent complementation)法を用いた。この方法は、相互作用を調べたい二つのタンパク質と、蛍光タンパク質である Venus を二つに分割した N 末側半分(V_N)、C 末側半分(V_C)とをそれぞれ融合タンパク質にし、相互作用した時のみ Venus の蛍光が発するという仕組みである (図 26)。

Mtg1、C10orf46 の C 末に Venus を半分に分割した V_N 、 V_C を融合した発現プラスミドを用意し、HeLa 細胞に Mtg1- V_N と C10orf46- V_C 、C10orf46- V_N と Mtg1- V_C の組み合わせでトランスフェクションし、共焦点顕微鏡で観察した。その結果が図 27 であり、多くの細胞では核で光っているのが観察された。核以外で光っている細胞もいくつか存在した。Venus のシグナルとミトコンドリアのシグナルと *marge* しているように見えるものもいたが、それらの多くはミトコンドリアが dot 状に光っているなど異常な染まり方をしていた。BiFC 法による解析では Mtg1 と C10orf46 がミトコンドリアで相互作用しているという確固たる証拠は示せなかった。

4. 考察

本研究ではミトコンドリアのリボソームの生合成におけるヒト G タンパク質、ObgH1 と Mtg1 の機能を解明しようとした。そして、ObgH1 や Mtg1 はミトコンドリアのリボソームの大サブユニット上で働き、ミトコンドリアの翻訳や呼吸鎖複合体のアセンブリーに参与していることを明らかにした。ここでは、本研究で得られた結果について考察していきたい。

4-1. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリア内局在

ミトコンドリアの分画の実験や proteinase K アッセイにより ObgH1 も Mtg1 もミトコンドリアの内膜とマトリクス側から相互作用していることがわかった。哺乳類ミトコンドリアの DNA にコードされている 13 個の蛋白質は全て呼吸鎖複合体のサブユニットであり、それらは全て膜タンパク質である。これらの膜タンパク質のみを合成するために、ミトコンドリアのリボソームは内膜と相互作用していると言われている。⁴⁾ また、ミトコンドリアのリボソームタンパク質である MRPL32 はリボソームに組み込まれる前から内膜上に局在しており、そこに未成熟なリボソームがリクルートされ、リボソームが成熟していくことが知られている。¹⁰⁾ バクテリアにおける MRPL32 ホモログであるリボソーム蛋白質 L32 は後期にアセンブリーされるタンパク質であることから、ミトコンドリアのリボソームのアセンブリーは後期になると内膜上で起きるのではないかと考えられる。バクテリアの Obg や YlqF はリボソームの後期のアセンブリーに参与していると言われており、^{32), 35), 37), 38)} ObgH1 や Mtg1 も内膜上でミトコンドリアリボソームの生合成の後期に参与しているのかもしれない。

4-2. ObgH1、Mtg1 のミトコンドリアリボソームとの結合と GTPase 活性

ミトコンドリアリボソームとの結合実験により ObgH1 や Mtg1 はミトコンドリアリボソームの大サブユニットに結合することがわかった。Mtg1 は GDPNP 存在下でのみ

大サブユニットと結合しており、GTP や GDP 存在下ではリボソームとは結合しないことがわかった。さらに、GTPase 活性の解析より、Mtg1 はリボソームの大サブユニット依存的な GTPase 活性を持つことが明らかになった。これらのことから、Mtg1 は GTP 型で大サブユニットと結合し、GTP の加水分解に伴って大サブユニットから解離すると考えられる。バクテリアにおいて YlqF は未成熟なリボソームの大サブユニットに GTP 型で結合し、リボソームが成熟すると GTP を加水分解し大サブユニットから解離していくことがわかっている。³⁹⁾ よって Mtg1 も未成熟なミトコンドリアリボソームに結合し、ミトコンドリアリボソームが成熟すると GTP の加水分解とともにリボソームから解離することで、未成熟なリボソームがミトコンドリア内での翻訳反応に参加しないようにするためのチェックポイントとして働いているのではないかと考えられる。また、バクテリアの GTPase である RsgA はリボソームの小サブユニットの生合成の後期においてリボソームの生合成因子である RbfA を解離させる働きがあることが知られており、²⁰⁾ Mtg1 も他の生合成因子を解離させるために働いているかもしれない。

Mtg1 は 39S 大サブユニット依存的な GTPase 活性を持つことがわかり、55S リボソームを用いて k_{cat} を求めたところ、 $k_{cat} = 0.031 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ であった。*O. sativa* の YlqF/YawG ファミリー蛋白質である Nug2 の 60S 大サブユニット依存的な GTPase の k_{cat} ($0.178 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$) とはほぼ同等であったが、*B. subtilis* の YlqF の 50S リボソーム依存的な GTPase の k_{cat} ($13.5 \pm 2.63 \text{ min}^{-1}$) と比べると、かなり小さいものとなっている。このことから本来の Mtg1 の GTPase の活性化因子が今回用いた成熟なリボソーム(55S リボソームや 39S 大サブユニット)ではない可能性も考えられる。未成熟なリボソームが活性化因子である可能性もある。さらにはリボソームの他に因子が必要であるかもしれない。

ObgH1 は GTP や GDPNP 存在下で大サブユニットと結合しており、GDP 存在下では結合しないことがわかった。このことから、ObgH1 も GTP 型でリボソームの大サブユニットと結合し、GTP を加水分解し、GDP 型になるとリボソームとは結合できなくなり解離するのではないかと考えられる。ObgH1 は intrinsic な GTPase 活性は検出できたが、リボソーム依存的な GTPase 活性は検出できなかった。この結果や GTP 存在下でもリボソームと安定的に結合していることから、今回調製したミトコンドリアのリボソームでは ObgH1 の GTPase 活性を活性化できず、他のメカニズムによって活性化され、GTP の加水分解が促進されると考えられる。*E. coli* において Obg の機能欠損株

では 50S サブユニットの生合成中間体が蓄積する。³²⁾ この中間体には RsfA/YbeB などの成熟した 50S に結合しているタンパク質の量が減っている。³²⁾ RsfA/YbeB のヒトミトコンドリアホモログである mtRsfA/C7orf30 はリボソームの生合成に関与していると言われており、^{24), 25)} このような生合成因子が ObgH1 の結合しているリボソームにリクルートされることで、ObgH1 が GTP を加水分解しリボソームから解離する可能性も考えられる。

次にブタ肝臓から調製した 55S ミトコンドリアリボソームと recombinant の ObgH1、Mtg1 を結合させた時のプロファイルについて考察する。図 9 において ObgH1 をミトコンドリアリボソームに結合させた時のリボソームのプロファイルと、Mtg1 を結合させた時のリボソームのプロファイルは異なっていることがわかる。図 9 と同様の実験を行い、GDPNP 存在下でブタ肝臓から調製した 55S リボソームと ObgH1 または Mtg1 を混合した時と、55S リボソームだけの時のリボソームプロファイルを比べると図 28 のようになる。まず、28S のピークを見ると、ObgH1 を結合させるとピーク面積が大きくなり、Mtg1 を結合させた時には少し小さくなることがわかる。次に 39S 大サブユニット付近のピークが大きく異なっていることがわかる。ここには明らかに複数の状態のものが混在しているのがわかる。ObgH1 を結合させた時にはピークが小さい方に偏っているのに対して、因子を入れないときや Mtg1 を結合させた時にはピークが ObgH1 を結合させ時に比べ大きい方にシフトしている。ObgH1 を結合させた時に 28S のピーク面積が大きくなり、それに伴って 39S のピークが左にシフトしていることを考えると、39S 付近のピークの中で小さい方が 39S であり、大きい方は 39S と 28S が結合しているが 55S にはなりきれていない不完全な会合体の可能性が考えられる。これらのことから、ObgH1 は anti-association factor として働き、ObgH1 が 39S 大サブユニットに結合することでサブユニットの解離している状態に平衡が偏っているのではないかと考えられる。それに対し、Mtg1 を加えた場合には 28S リボソームのピークが少し下がることから、リボソームが会合している状態に平衡をずらしているのではないかと考えられる。図 9 の Mtg1 の結合をみると 39S 付近のピークに幅広く結合しており、小さい方のピークにも大きい方のピークにも結合することがわかる。つまり Mtg1 が 39S 大サブユニットに結合しても、28S 小サブユニットが 39S 大サブユニットに結合できるのかもしれない。

4-3. Mtg1 をノックダウンした時の細胞に与える影響

Mtg1 を RNAi によりノックダウンした時のミトコンドリアの rRNA、リボソーム蛋白質、ミトコンドリアの翻訳活性、呼吸鎖複合体に与える影響について調べた。*O. sativa* において細胞質のリボソームの生合成に参与すると言われている YlqF/YawG ファミリー蛋白質の Nug2 を欠損させると、rRNA の前駆体が蓄積されることが知られている。⁴⁷⁾ また、酵母ミトコンドリアの Mtg1 を欠損させると rRNA の分解が起きることが報告されている。²⁴⁾ 今回、Mtg1 をノックダウンしても rRNA の分解や前駆体の蓄積は見られなかった。バクテリアの YlqF を欠損させた時の rRNA についてはこれまでに報告されていない。バクテリアの YlqF を欠損させた時に蓄積する大サブユニットの中間体はリボソーム蛋白質の L16、L27、L36 が抜け落ちただけのものであり、³⁵⁾⁻³⁸⁾ rRNA は成熟したものになっている可能性も考えられる。哺乳類ミトコンドリアの rRNA は mtDNA のゲノムから転写されたときに余分な配列がほとんどついておらず、プロセシングの過程はバクテリアや細胞質の rRNA のプロセシングと異なり、tRNA を切り出せばよいだけである。^{51), 52)} そのため、Mtg1 をノックダウンしても rRNA の分解や前駆体の蓄積が検出できなかったのかもしれない。また、ノックダウンの実験では Mtg1 を細胞内から完全に除くことはできず、残存した Mtg1 が機能することで rRNA への影響を軽減している可能性も考えられる。また、リボソーム蛋白質に関しても、Mtg1 をノックダウンしても細胞内での量に大きな変化はなかった。本研究では MRPL7/L12、MRPL45、MRPS29、MRPS12 の蛋白量しか解析しておらず、他のリボソーム蛋白質では変化が生じているかもしれない。リボソームの生合成に異常が生じても、細胞内でのリボソーム蛋白質の量に変化がないという報告もある。²⁵⁾ Mtg1 がミトコンドリアリボソームの生合成に参与しているかについては Mtg1 をノックダウンした細胞のミトコンドリアリボソームのプロファイルを解析し、プロファイルに変化があるか、さらにはミトコンドリアリボソーム蛋白質の挙動に変化はないかを解析する必要がある。また Mtg1 をノックダウンしたミトコンドリアのリボソームを回収してリボソーム蛋白質に関して網羅的に解析することができれば、どのリボソーム蛋白質がリボソームに組み上がるのに Mtg1 が必要かわかると考えられる。図 15 に示すように Mtg1 をノックダウンした細胞では、ミトコンドリアの翻訳活性が全体的に低下していた。これはリボソームの生合成に欠陥が生じ、成熟したリボソームの量が減少したためだと考えられる。また、呼吸鎖複合体のアセンブリーについて解析したところ、図 17 に示すように mtDNA にコードされた蛋白質をサブユニットに持つ複合体のアセンブリーは異常になってお

り成熟した複合体の量が減少していた。核の DNA にコードされたサブユニットのみで構成される Complex II のアセンブリーはほとんど影響がなかった。このことは Mtg1 をノックダウンするとミトコンドリアの翻訳活性が全体的に低下することと矛盾しない。

4-4. ObgH1 をノックダウンした時の細胞に与える影響

ObgH1 を RNAi によりノックダウンした時のミトコンドリアの rRNA、リボソーム蛋白質、ミトコンドリアの翻訳活性、呼吸鎖複合体に与える影響について調べた。*E. coli* の Obg の機能を欠損させると、大サブユニットの rRNA だけでなく、小サブユニットの rRNA に関しても前駆体が蓄積することが知られている。^{31), 32)} 今回、ObgH1 をノックダウンしても、Mtg1 の時と同様に rRNA の分解、前駆体の蓄積は見られなかった。リボソーム蛋白質についてもほとんど変化はなく、リボソームの生合成に参与するという証拠は得られなかった。ObgH1 をノックダウンした時のミトコンドリアの翻訳活性を解析すると、多くの蛋白質の翻訳活性は変化がないのに対し、Complex V のサブユニットである ATP6、ATP8 の翻訳量が特異的に上昇する結果を得た。さらに、呼吸鎖複合体のアセンブリーを解析すると、Complex V のアセンブリーのみが異常になっており、そのほかの複合体に影響はなかった。このことから ObgH1 が Complex V のサブユニットの翻訳、さらには Complex V のアセンブリーに参与していることが示唆された。哺乳類ミトコンドリアの ATP6 と ATP8 は同じ mRNA 上にコードされている。ObgH1 をノックダウンすると ATP6 と ATP8 のみ翻訳量が上昇していることを考えると、ATP6 と ATP8 をコードしている mRNA の安定性が上がり mRNA 量が増加している可能性も考えられる。Complex V のサブユニットの翻訳は呼吸鎖複合体のアセンブリーの状態に影響されることが知られている。例えば、酵母のミトコンドリアにおいて、ATP6 と ATP8 の合成には Complex V の一部である F1 ATPase が必要であり、F1 ATPase がない時にはほとんど翻訳がおきないことが知られている。⁵³⁾ また、Complex III や IV のアセンブリーが異常になっている場合に、ATP6 や ATP8 の翻訳量が上昇していることが報告されている。⁵⁴⁾ ObgH1 のノックダウンによって本研究では検出できなかったような呼吸鎖複合体のアセンブリーの異常があり、その結果、Complex V のサブユニットの翻訳活性を上昇させた可能性も考えられる。

ミトコンドリアリボソームの生合成因子と呼吸鎖複合体のアセンブリーの関係について知られていることがある。酵母の Mtg3 のヒトホモログである NOA1/C4orf14 はミトコンドリアリボソームの小サブユニットに結合し、小サブユニットの生合成に関与するとされている。²⁹⁾ その一方で、呼吸鎖複合体の Complex IV に結合し、Complex IV のアセンブリーや安定性に関与することも報告されている。⁵⁵⁾ ObgH1 も NOA1/C4orf14 と同様に呼吸鎖複合体、特に Complex V に結合して Complex V のアセンブリーに関与する可能性も考えられる。

ObgH1 をノックダウンしたときと Mtg1 をノックダウンしたときの細胞へ与える影響は異なっていた。Mtg1 をノックダウンするとミトコンドリアの翻訳活性が全体的に低下するのに対して、ObgH1 をノックダウンした時には全体的な翻訳活性はそれほど大きな変化はなかった。ObgH1 は *E. coli* の ObgE の欠損による生育障害を相補できることから、ObgE と同様にリボソームの生合成に関わると考えられる。ミトコンドリアのリボソームの生合成に関わる因子であるとする、ノックダウンした時には Mtg1 の時のようにミトコンドリアの翻訳活性が全体的に低下するのではないかと考えられる。では、なぜ ObgH1 のノックダウンはミトコンドリアの全体的な翻訳活性にそれほど大きな影響を与えなかったのだろうか。まずは ObgH1 の量について考えてみる。RNAi によるノックダウンでは遺伝子発現の抑制ではどうしても少し蛋白質が残存してしまう。図 14 で示すように、ObgH1 をノックダウンした細胞でもコントロールの 15% の ObgH1 は残存している。このわずかに残った ObgH1 がミトコンドリアのリボソームの生合成に関して機能し、十分であったためにミトコンドリアの翻訳活性が変わらなかった可能性が考えられる。さらに図 14 を見ると ObgH1 をノックダウンした時に Mtg1 の量が少し増加していることが見て取れる。この Mtg1 のように ObgH1 をノックダウンすることで発現量が変化する蛋白質がほかにも存在するかもしれない。このような蛋白質の発現量の変化により ObgH1 のノックダウンを相補している可能性も考えられる。

E. coli や *C. crescentus* では、Obg 蛋白質の変異で染色体の複製や分配に欠陥が生じることが知られており、^{18), 56), 57)} Obg 蛋白質は DNA のメタボリズムと翻訳とを繋ぐ役割があるのではないとも言われている。哺乳類のミトコンドリアにおいては、mtDNA の維持や複製に関わるミトコンドリアの核様体の構成要素である ATAD3 を含む複合体に ObgH1 が含まれているという報告がある。⁵⁸⁾ そのため ObgH1 は mtDNA のメタボリズムとミトコンドリアの翻訳とを繋ぐ役割をしている可能性も考えられる。

4-5. Mtg1 とミトコンドリアリボソームとのクロスリンク

Mtg1 とミトコンドリアリボソームの大サブユニットとのクロスリンクの実験により C10orf46 が Mtg1 のクロスリンクのパートナーとして同定された。3-6 項でも述べたように C10orf46 はミトコンドリアのリボソーム蛋白質でもなく、ミトコンドリアに局在する蛋白質としても知られていない。ミトコンドリアリボソームをブタの肝臓から調製するとき、同じくらいの大きさのものが混じってしまう可能性も考えられる。しかし、本実験においてはまず 55S リボソームを調製したあとに、 Mg^{2+} 濃度を下げることでサブユニットに解離させ、もう一度ショ糖密度勾配で分離をして 39S 大サブユニットを調製している。そのため、リボソーム以外の複合体などが独立に混じってくる可能性はかなり低いと考えられる。

C10orf46 は細胞周期に関わる因子である CDK2 と相互作用し、CDK2 の活性を制御している。⁴⁹⁾ C10orf46 は G1 後期から S 期にかけて発現量が上がり、S 期中期あたりで発現量は下がり、S 期後期から G2 期にかけて再び発現量が上がることが知られている。⁴⁹⁾ 免疫染色法によって C10orf46 の局在が調べられており、G0 期には細胞質に局在し、G1 期になると核に局在を移す。S 期の間はそのまま核に局在しているが、G2 期になると細胞質にも広がり、M 期になると細胞質に局在するようになることが報告されている。⁵⁰⁾ また、C10orf46 を過剰発現させるとミトコンドリアの呼吸鎖複合体の Complex II の活性が上昇し、細胞増殖が活性化されることが示されている。それに対し、C10orf46 を RNAi により発現抑制をすると Complex II の活性が低下し、G1/S arrest を引き起こされ、細胞増殖が阻害されることが示されている。⁴⁹⁾ これらのことから、C10orf46 が細胞増殖やミトコンドリアの活性に関与していることがわかる。本研究では哺乳類ミトコンドリアリボソームの生合成因子と考えられる Mtg1 と C10orf46 のミトコンドリア内での相互作用について BiFC 法を用いて解析を行った。しかし、ミトコンドリア内で相互作用するという決定的な証拠は得られなかった。Mtg1 と C10orf46 のどちらかのみを venus と融合させると、片方の局在に影響を受けるような結果も得ている。そのため局在が異なる二つの蛋白質を解析するのは難しいのかもしれない。また、C10orf46 は細胞周期によって局在が変わることは明らかなので、細胞周期を揃えて実験を行うことで、得られる結果が変わってくるかもしれない。C10orf46 と Mtg1 がミトコンドリア内で相互作用し、何らかの機能を果たしていることが示すことができれば、細胞周期とミトコンドリアリボソームの生合成が連動して働くための機

構の発見につながるかもしれない。

4-6. ObgH の作業仮説

本研究で得られた ObgH1 についての結果をもとに次のような作業仮説を考えている (図 29)。ObgH1 は GTP 型でリボソームの大サブユニットと結合し、大サブユニットを Complex V の近傍で正しく配置することで、Complex V の近傍で ATP6 や ATP8 の翻訳が行われるようにしているのではないかと考えている。そうすることで ATP6 や ATP8 が速やかに Complex V に組み込まれ、ATP6 や ATP8 の翻訳と Complex V のアセンブリーが制御されているのではないかと考えられる。ObgH1 をロックダウンした時には、リボソームの大サブユニットが正しく配置されず、ATP6 と ATP8 の翻訳と Complex V へのアセンブリーが連動されず、Complex V のアセンブリーは異常になり、ATP6 や ATP8 の翻訳量も異常に増加したのではないかと考えている。

4-7. Mtg1 の作業仮説

本研究で得られた ObgH1 についての結果やバクテリアの YlqF の機能をもとに次のような作業仮説を考えている (図 30)。Mtg1 が内膜上で未成熟なミトコンドリアリボソームの大サブユニット (Pre-39S) に GTP 型で結合し、結合することでいくつかのリボソーム蛋白質がリクルートされ、リボソームが成熟するのではないかと考えている。リボソームが成熟すると Mtg1 が GTP を加水分解し、GDP 型になるとリボソームから解離していくと考えられる。Mtg1 をロックダウンした場合には、リボソームの生合成が途中でストップしてしまい、Pre-39S の状態で止まってしまうのではないかと考えられる。そのため、成熟したリボソームの量が減少し、ミトコンドリアの翻訳活性の低下や呼吸鎖複合体のアセンブリーの異常が観察されたと考えられる。

5. 表と図

表1 *E. coli* のリボソーム蛋白質とヒトミトコンドリアのリボソーム蛋白質の比較 (小サブユニット)

<i>E. coli</i> small subunit			Human mitochondrial small subunit		
Protein	MW (kDa)	pI	Protein	MW (kDa)	pI
S1	61	4.8			
S2	26.7	7.1	MRPS2	30.1	9.1
S3	26	10.9			
S4	23.4	10.6			
S5	17.6	10.8	MRPS5	38.8	10.6
S6	15.1	5.3	MRPS6	13.8	9.5
S7	20	10.9	MRPS7	24.3	9.6
S8	14	10.1			
S9	14.8	11.3	MRPS9	40.5	9.9
S10	11.7	10.3	MRPS10	17.7	6.2
S11	13.8	11.5	MRPS11	20	11.1
S12	13.7	11.3	MRPS12	12.8	10.9
S13	13.1	11.2			
S14	11.5	11.4	MRPS14	13.2	11.5
S15	10.2	10.9	MRPS15	27.9	10.9
S16	9.2	11	MRPS16	14.3	10.2
S17	9.7	10.3	MRPS17	12.9	10.3
			MRPS18A	18.8	10.9
			MRPS18B	27	9.9
S18	8.9	11	MRPS18C	11.7	10.2
S19	10.4	11.2			
S20	9.6	11.6			
S21	8.5	11.4	MRPS21	10.5	10.7
			MRPS22	35.3	6.4
			MRPS23	21.2	9
			MRPS24	15.3	9.9
			MRPS25	20	9.4
			MRPS26	21.3	10.2
			MRPS27	44.6	5.4
			MRPS28	13.1	8.2
			MRPS29	43.1	9
			MRPS30	47.7	7.3
			MRPS31	39.4	10
			MRPS33	9.7	10.8
			MRPS34	25.7	10.6
			MRPS35	34.6	8
			MRPS36	10.2	10.2

O'Brien, T.W. (2003)⁶⁾から引用。

Human mitochondrial ribosomal protein の MW の値は N 末配列解析から決められた成熟した蛋白質のもの、または TargetP や MitoProt から予測された成熟した蛋白質の値。

MRPS18 は 3 つの isoform が存在する。

表 2 *E. coli* のリボソーム蛋白質とヒトミトコンドリアのリボソーム蛋白質の比較 (大サブユニット)

<i>E. coli</i> large subunit			Human mitochondrial large subunit			<i>E. coli</i> large subunit			Human mitochondrial large subunit		
Protein	MW (kDa)	pI	Protein	MW (kDa)	pI	Protein	MW (kDa)	pI	Protein	MW (kDa)	pI
L1	24.7	10.3	MRPL1	32	7.3				MRPL43	20.7	9.6
L2	29.9	11.3	MRPL2	28.2	11.5				MRPL44	34.4	7.3
L3	22.2	10.6	MRPL3	34.4	9.9				MRPL45	33.7	9.6
L4	22	10.4	MRPL4	33	9.9				MRPL46	28.2	5.6
L5	20.3	10.1							MRPL47	28.2	10.9
L6	18.9	10.3							MRPL48	20.6	8.2
L9	15.8	6.5	MRPL9	24.8	10.1				MRPL49	16.4	7.4
L10	17.7	9.6	MRPL10	26.4	9.6				MRPL50	17.8	7.3
L11	14.9	10.3	MRPL11	16.3	9.8				MRPL51	11.7	11.4
L12	12.3	4.56	MRPL12	16.5	5.3				MRPL52	11.3	7.4
L13	16	10.5	MRPL13	19	9.4				MRPL53	12.1 ^P	9.4
L14	13.5	11	MRPL14	12.6	11				MRPL54	14.3	9.7
L15	15	11.5	MRPL15	31.3	10.5				MRPL55	11.6	10.7
L16	15.3	11.5	MRPL16	25.3	10.1				MRPL56	58.8	8.7
L17	14.4	11.3	MRPL17	19.4	10.5						
L18	12.8	11	MRPL18	18	9.6						
L19	13.1	11.1	MRPL19	29	10						
L20	13.5	11.6	MRPL20	16.4	11.2						
L21	11.6	10.5	MRPL21	18.9	10.2						
L22	12.2	10.9	MRPL22	19.4	10.4						
L23	11.2	10.7	MRPL23	14.1	8.5						
L24	11.3	11	MRPL24	23.9	9.7						
L25	10.7	10.2									
L27	9.1	11.2	MRPL27	13	10.4						
L28	9	11.6	MRPL28	27	8.3						
L29	7.3	10.7									
L30	6.5	11.3	MRPL30	14.7	10.7						
L31	7.9	10									
L32	6.4	11.4	MRPL32	12.8	9.8						
L33	6.4	10.9	MRPL33	6.7	10.8						
L34	5.4	13	MRPL34	5.4	12.3						
L35	7.3	12	MRPL35	21.5 ^P	11.6						
L36	4.4	11.3	MRPL36	4.9	11.2						
			MRPL37	45.3	8.8						
			MRPL38	41.2	9.3						
			MRPL39	36.6	7.5						
			MRPL40	19.3	10						
			MRPL41	14	10						
			MRPL42	13.1	7.2						

O'Brien, T.W. (2003)⁹⁾から引用。

Human mitochondrial ribosomal protein の MW の値は N 末配列解析から決められた成熟タンパク質のもの、または TargetP や MitoProt から予測された成熟タンパク質の値。

P : MRPL35 や MRPL53 の mass の値は前駆体の値。

表3 mt リボソーム蛋白質の異常によるヒト疾患

遺伝子	疾患	文献
MRPS6	パーキンソン病	11
MRPS12	難聴 (常染色体優勢遺伝)	7
MRPS14	難聴 (常染色体優勢遺伝)	7
MRPS16*	ミトコンドリア脳筋症	8, 13
MRPS22*	ミトコンドリア脳筋症	12, 13
MRPS23	網膜色素変性症	7
MRPS26	Hallervorden-Spatz 症候群	7
MRPL3*	心筋症、精神運動遅滞	7, 14
MRPL4	難聴 (常染色体劣勢遺伝)	7
MRPL9	網膜色素変性症	7
MRPL32*	遺伝性痙性対麻痺	10
MRPL37	パーキンソン病	9
MRPL39	Usher 症候群	7
MRPL44	乳児心筋症	15

* : mt リボソームの生合成に異常があることが示唆されている。

表 4 ObgH1、Mtg1 の GTPase 活性

	k_{cat} (min^{-1})	Reference
ObgH1	0.014 ± 0.005	30
ObgH1 + 55S	N.D.	This study
Mtg1	N.D.	This study
Mtg1 + 55S	0.031 ± 0.001	This study

データは 3 回の実験の平均 \pm 標準偏差を示す。

N.D. = not detected.

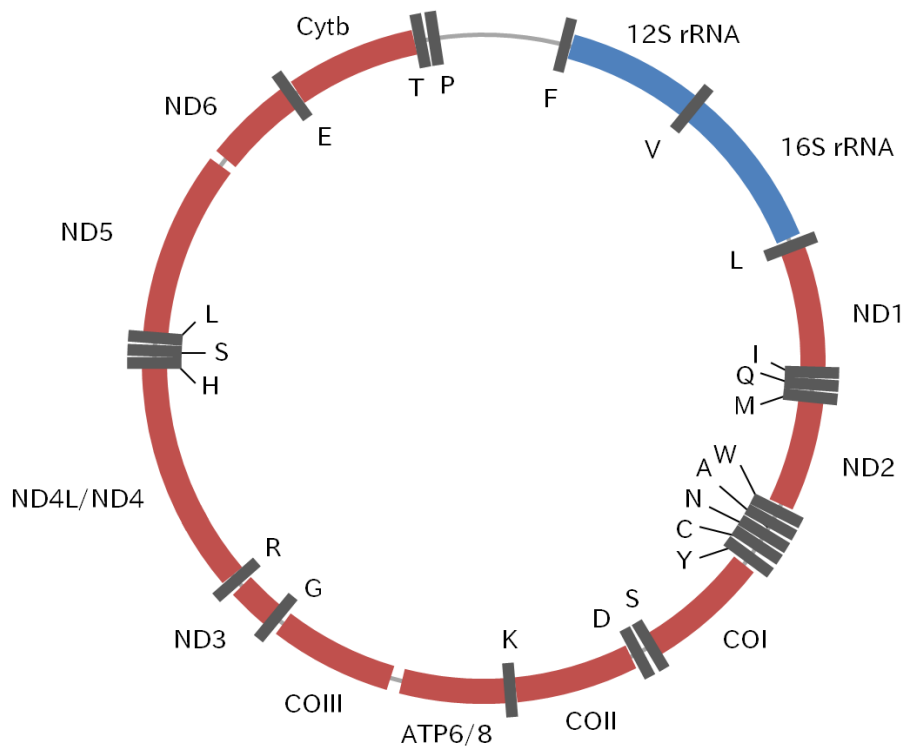


図1 哺乳類のミトコンドリア DNA にコードされている遺伝子

哺乳類ミトコンドリア DNA には2個のミトコンドリアリボソーム RNA (青色)と22個の tRNA(灰色、チャージされるアミノ酸を1文字表記で示した)と13個の蛋白質(赤色)をコードされている。リボソーム RNA は12S rRNA と16S rRNA がコードされている。tRNA は $tRNA^{Leu}$ と $tRNA^{Ser}$ が2種類ずつ、その他の tRNA が1種類ずつコードされている。蛋白質は呼吸鎖複合体の Complex I のサブユニットが7種類 (ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6)、Complex III のサブユニットが1種類 (Cytb)、Complex IV のサブユニットが3種類 (COI、COII、COIII)、Complex V のサブユニットが2種類 (ATP6、ATP8)がコードされている。

Mtg1 (<i>H. sapiens</i>)	1	--- MRLLTPRALCSAAQAAVRENFPLCGRDVARWFPGHVAKGLKKMQSSLKLVDCLIEVH
Mtg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	1	MHINVRGTRKIISNVSSFTPRYEFPKYS-MPLTDFKGHQVKALKTFEKLIPQNMNILELR
YlqF (<i>B. subtilis</i>)	1	-----MTIQWFPGHVAKARREVEKLLKLI DLYVELV
Mtg1 (<i>H. sapiens</i>)	57	DARIPLSGRNPLFQETLGLKPHLLVLLNKMDLADLTEQOK-I MQHLEGEGLKNVIFINCVK
Mtg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	60	DIRAPLSTRNVVFDRIARKEHDVVKLVVYTRKDLMPGNKPYI GKLKNVHEELGEKFI LLD
YlqF (<i>B. subtilis</i>)	32	DARIPMSRRNPMEDLLKKNPRI ML LNKADKADA AVTQQ- MKEHFE NQGLR- SLSI NSVN
Mtg1 (<i>H. sapiens</i>)	116	DENVKQILPMVTELLGRSHRYHRKE--- NLEYCI MVLGVPNVGKSSLI NSLRRQHLRKG-
Mtg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	120	CRNKT DVRNLLKILEWQNYELE TNGGYLPNGYRALITGMPNVGKSTLINSLRITIFHNQVN
YlqF (<i>B. subtilis</i>)	90	GQGLNQLVPAASKEL LQEKFD RMRAGVKKPRAI RALI IGLPNVGKSTLINSLRITIFHNQVN
Mtg1 (<i>H. sapiens</i>)	172	-----KATRVGGEPGITRAVMSKIQVSEI----- PLMFLLDTPGVLAP-RIESVETGLK
Mtg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	180	MGRKFKIVAKTGAAGVTRATSEVIRVTSRINTESRNEIYLLIDTPGIVPGRVSDHNRMLG
YlqF (<i>B. subtilis</i>)	148	-----TGDRPGIT---TSQQWVKVG----- KELELLDTPGIVLP- KFEDELVGLR
Mtg1 (<i>H. sapiens</i>)	220	LALCGT VL D HLVGEETMADYLLYL LNKHQ R- FGYVQHYG- - LGSACDNVERVLKSVAVKL
Mtg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	240	LALCGSVKNNLVDP I FQADYLLYL LNKHQ R- FGYVQHYG- - LGSACDNVERVLKSVAVKL
YlqF (<i>B. subtilis</i>)	189	LAVTGAIKDSITNLQDVAVFGLRFL EEHYP- ERLKERYG- - LDEIPEIDIAELFDATGEKR
Mtg1 (<i>H. sapiens</i>)	277	GKTQKVKVLTGTGNVNI QPNYPAAARDFLQ----- TFRRLGLGSVMLDL DVLRG
Mtg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	300	SQNEKSTALEVTNKVRLHGKGIIFDPEVLLNDEF SYKNYVNDQLEKLGDL SYEGLSNKL
YlqF (<i>B. subtilis</i>)	246	GCLMSGGLIN-----YDKTT EVIIR----- DI RTEKFGRLSFEQPTM--
Mtg1 (<i>H. sapiens</i>)	327	HPPAETLP
Mtg1 (<i>S. cerevisiae</i>)	360	KGNPNQVF
YlqF (<i>B. subtilis</i>)		-----

図2 YlqF 蛋白質のアライメント

H. sapiens の Mtg1 と *S. cerevisiae* の Mtg1 と *B. subtilis* の YlqF のアミノ酸配列を比較。Clustal W を用いてアミノ酸配列を並べた。

```

ObgH1 (H. sapiens)      1  --MAPARCFSS--ARLRTVFQGVGHWALSTWAGLKPSR-----LPLQRASPRLLSVGRAD
Mtg2 (S. cerevisiae)  1  MSIAMSSVFRKRELRLERFLPRVYSTKVPDNAPRAADNEQMLETLRPI THPEQKKSIDHDVS
ObgE (E. coli)        1  -----

```

```

ObgH1 (H. sapiens)      51  LAKHQELPGKLLSEKKIKRY-----FVDYRRVLCVGGNGGAGASCFHSEPRKEFG
Mtg2 (S. cerevisiae)  61  YTRHINVPLGEVTSVNYLQRYNKHKHSQGNFVDVRI VKCKSGAGGSGAVSFRDAGRSLG
ObgE (E. coli)        1  -----MKFVDEASTLVVAGDGGNGCVSFRREKYI PKG

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     102  GPDGGDGGNGGHVILRVDQVKSLSS--SVLSRYQGFSGEDGGSKNCFGRSGAVLYLRVPPV
Mtg2 (S. cerevisiae)  121  PPDGGDGGAGGSVYI QAVAGLGS LA--KMKTTYTAFDGEAGAARQLDGMGRIDVLI QVPV
ObgE (E. coli)       33  GPDGGDGGDGGDVMMEDENLNTLI DYRFKSFRAERQNGASRDCTGKRKGDVTLKVPV

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     160  GTLVK-----
Mtg2 (S. cerevisiae)  179  GTVVKMCLPPQKVRELVREMRKDNNATLRSILGSTAVNLSVSSGSHRKKIQLYRHEMAE
ObgE (E. coli)       93  GTRVTD-----

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     165  -----EGGRVVADLSCVGDVYLAALG-----
Mtg2 (S. cerevisiae)  239  SWLFKDKAKELYENKDVFKDLHKKMEAYDHSLEQSELFNDQFPLAGLDL NQPNTKPVCLL
ObgE (E. coli)       99  -----QGTGETMGDMTKHGQRLLVAKG-----

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     186  --GAGGKGNRFFLANNRAPVCTPGQPGQQRVHLELKTVAHAGMVGFPNAGKSL LRA
Mtg2 (S. cerevisiae)  299  KGGQGLGNMFLTNLIRNPRFSKPRNGLEQHFLELKSIALDGLI GLPNAGKSTILNK
ObgE (E. coli)       121  --GWHGLGNTREFKSSVNRTPRQKNTGTPGDKRELLLELMLLADVGM LGMPNAGKSTIFRA

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     244  ISNARPAVASYPFTTLKPHVGI VHY-EGHLQI AVADI PGI I RGAHQNRGLGS AFLRHI ER
Mtg2 (S. cerevisiae)  359  ISNAKPKLGHWFITLSPITIGT VSLGFQDVFIVADI PGI I QGASLDKGMGL EFLRHI ER
ObgE (E. coli)       179  VSAAKPKVADYPFTTLVPSLGVVRV-DNEKSFVVADI PGLI EGAAEGAGLGLRFLKHLER

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     303  CRFLLFVVDLS--QPEPMTQVDDLYELEMVEKGLSARPHAVANKIDLPEAQAN----
Mtg2 (S. cerevisiae)  419  SNGWVFLDLS--NKPLNDLQLTEEVGTLEK-VKTKNILLVGNKVDIDAEKSESAFK
ObgE (E. coli)       238  CRVLLHLIDIDPI DGTDPVENARITISELEKYSQDLATKPRVLFNKI DLDKVEAEEKA

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     356  LSCLRDHLGQEVI VLSALT---GENLEQLLLHLKVLYDAYAEAE LGGGRQPLRM-----
Mtg2 (S. cerevisiae)  475  YLQVEKFSKSKQEMDCVPI S---ALRENI DVLKMKMFKCARQSEFDK-----
ObgE (E. coli)       298  KATAEALGWEDKYYLL SAASGLGVKDL CVDVMTFIIENPVVQAEAKQPEKVEFMDDYH

```

```

ObgH1 (H. sapiens)     -----
Mtg2 (S. cerevisiae)  -----
ObgE (E. coli)       358  RQQLEEI AEE DDE DMDDWDE DDE E GVE FI YKR

```

図3 Obg 蛋白質のアライメント

H. sapiens の ObgH1 と *S. cerevisiae* の Mtg2 と *E. coli* の ObgE のアミノ酸配列を比較。Clustal W を用いてアミノ酸配列を並べた。

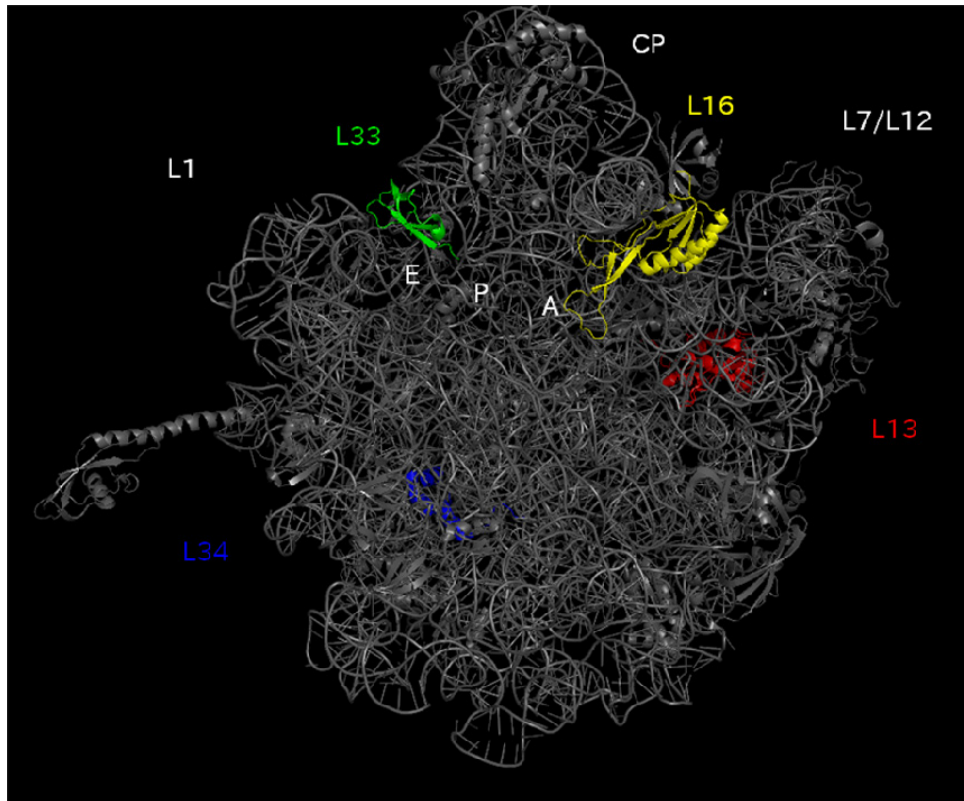


図4 Obg に関わるリボソーム蛋白質の位置

E. coli の 50S 大サブユニット結晶構造 (PDB ID : 3R8S)。Interface から見た構造。Obg はリボソーム蛋白質 L13 と直接相互作用する。Obg を機能欠損させた株で蓄積する未成熟な大サブユニットにはリボソーム蛋白質 L16、L33、L34 の量が減少している。

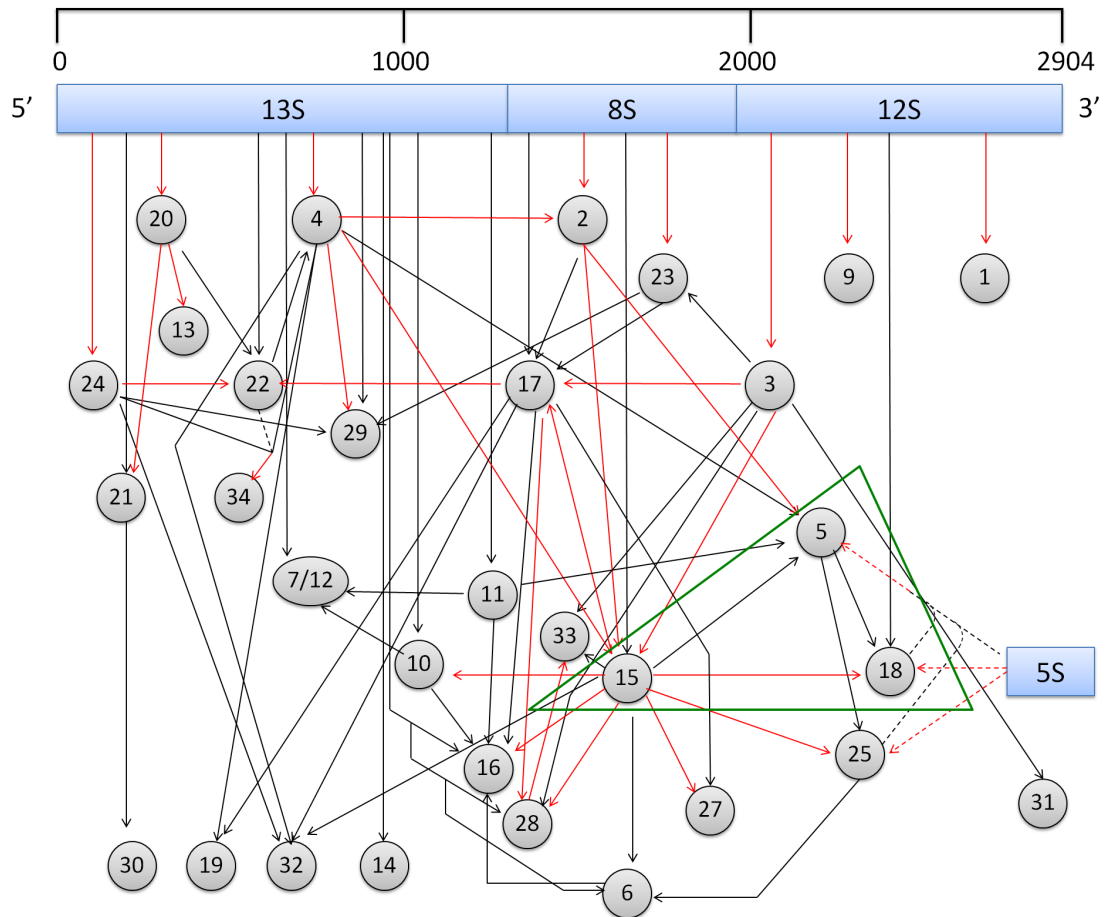


図5 リボソームの50S大サブユニットのアセンブリーマップ

23S rRNA(13S、8S、12S)にリボソームの大サブユニットの蛋白質(○で示した)と5S rRNAが結合していく順番を示す。赤の矢印は結合に強い依存性を持つことを示し、黒の矢印は弱い依存性を持つことを示す。緑で囲まれた蛋白質は5S rRNAの組み込みに必須の蛋白質である。この図は Herold M *et al.* (1987)⁵⁹、Kaczanowska M *et al.* (2007)⁶⁰から引用。

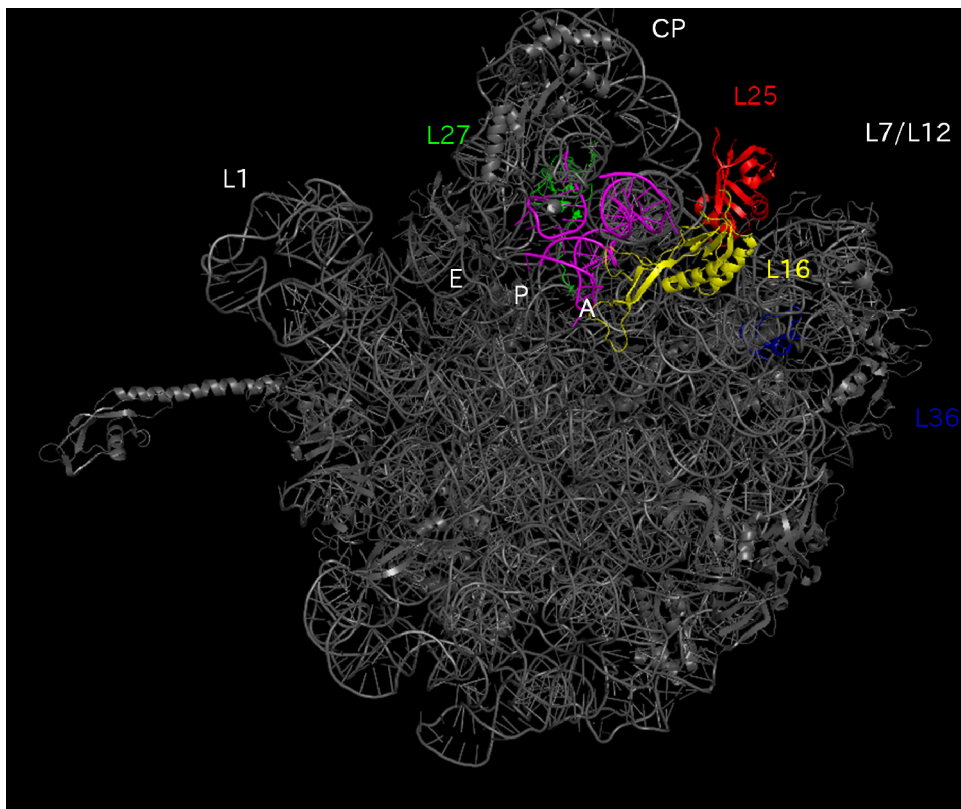


図6 YlqF に関わるリボソーム蛋白質、rRNA の位置

E. coli の 50S 大サブユニット結晶構造 (PDB ID : 3R8S)。Interface から見た構造。YlqF はリボソーム蛋白質 L25 と直接相互作用する。YlqF を欠損させた株で蓄積する未成熟な大サブユニットにはリボソーム蛋白質 L16、L27、L36 の量が減少している。Magenta で示したのが DMS footprint 解析で保護された塩基付近の rRNA (Helix 38 の一部、Helix81、 Helix 85)。

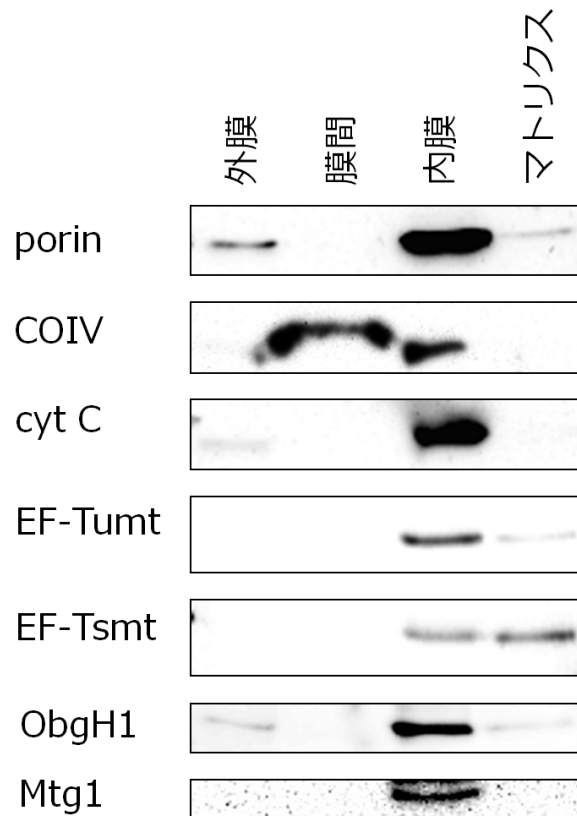
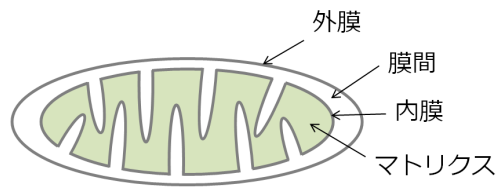


図7 ObgH1 と Mtg1 のミトコンドリア内の局在 (ミトコンドリアの分画)

ミトコンドリアは外膜、膜間、内膜、マトリクスの4つの領域に分けることができる(上)。培養細胞からミトコンドリアを調製し、外膜、膜間、内膜、マトリクスに分画した。それぞれのフラクションについてウエスタンブロッティングを行い、蛋白質を検出した(下)。外膜タンパク質のコントロールとして Porin、膜間のタンパク質のコントロールとして cyt C、内膜タンパク質のコントロールとして COIV、マトリクス蛋白質のコントロールとして EF-Tumt と EF-Tsmt についてウエスタンブロッティングを行った。

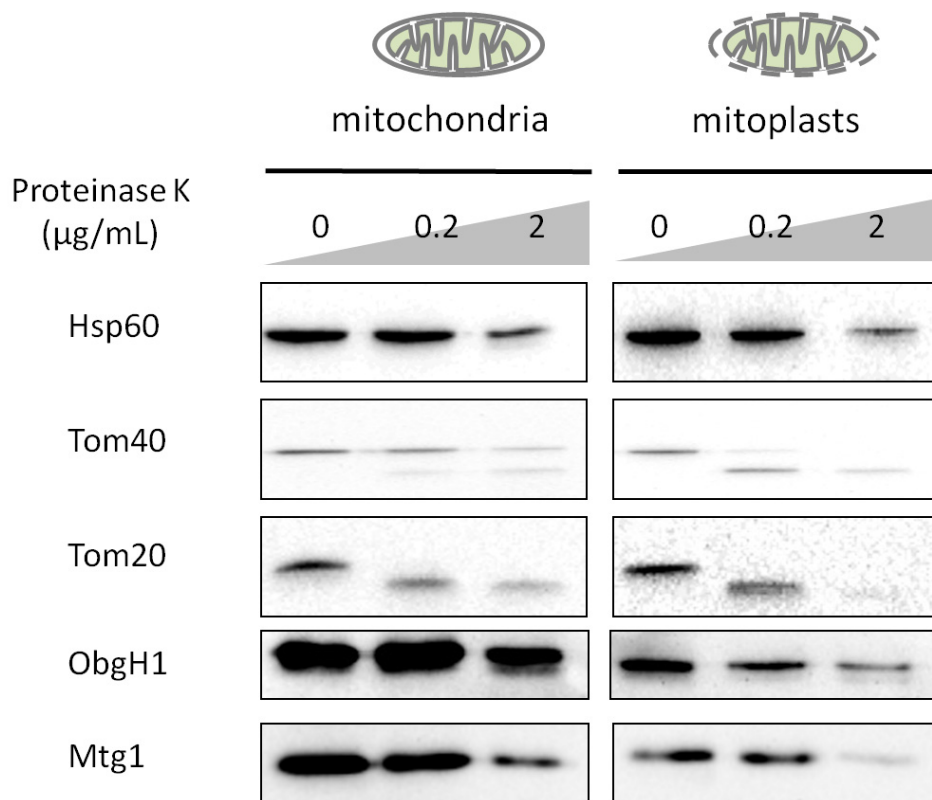


図8 proteinase K assay

ミトコンドリアとミトプラストを調製し、Proteinase K (0, 0.2, 2 $\mu\text{g/ml}$)を加え、氷上で30分インキュベートし、ウエスタンブロッティングを行い、それぞれの蛋白質を検出した。マトリクスのタンパク質として Hsp60、膜間に露出した領域をもつ外膜タンパク質として Tom40、細胞質に露出した領域をもつ外膜タンパク質として Tom20 をコントロールとしてウエスタンブロッティングを行った。

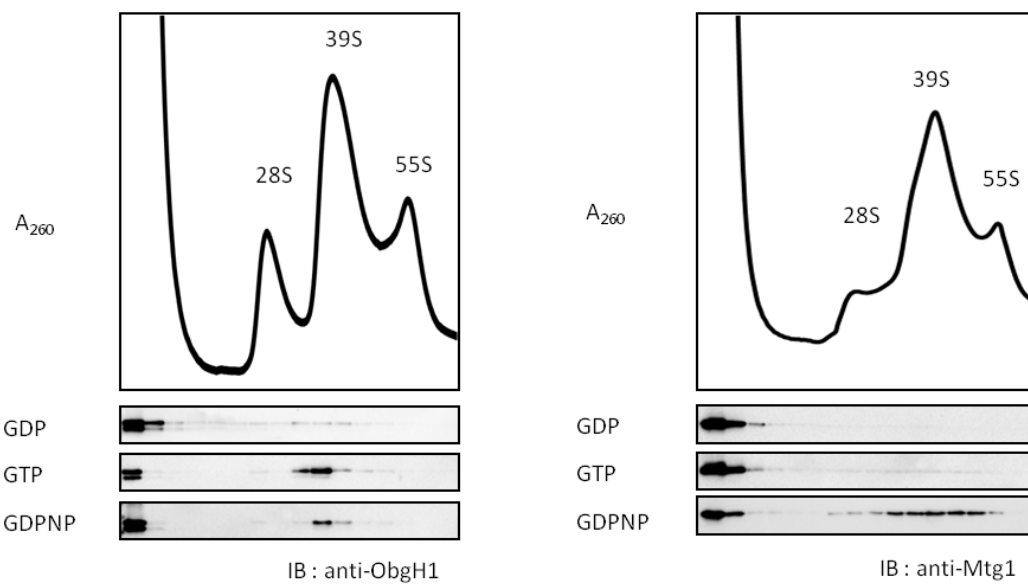


図9 ObgH1、Mtg1 とミトコンドリアリボソームの相互作用解析(*in vitro*)

精製した55S (f.c. 0.2 μM) リボソームと recombinant の ObgH1 (左) と Mtg1 (右) (f.c. 2 μM) を様々な種類のグアニンヌクレオチド存在下で混合し、15-30% (w/v) のショ糖密度勾配により分離した (39,000 rpm, 5.5 h, SW41Ti rotor (Beckman Coulter))。フラクションをそれぞれ ObgH1、Mtg1 に対する抗体を用いウエスタンブロッティングにより ObgH1、Mtg1 を検出した。

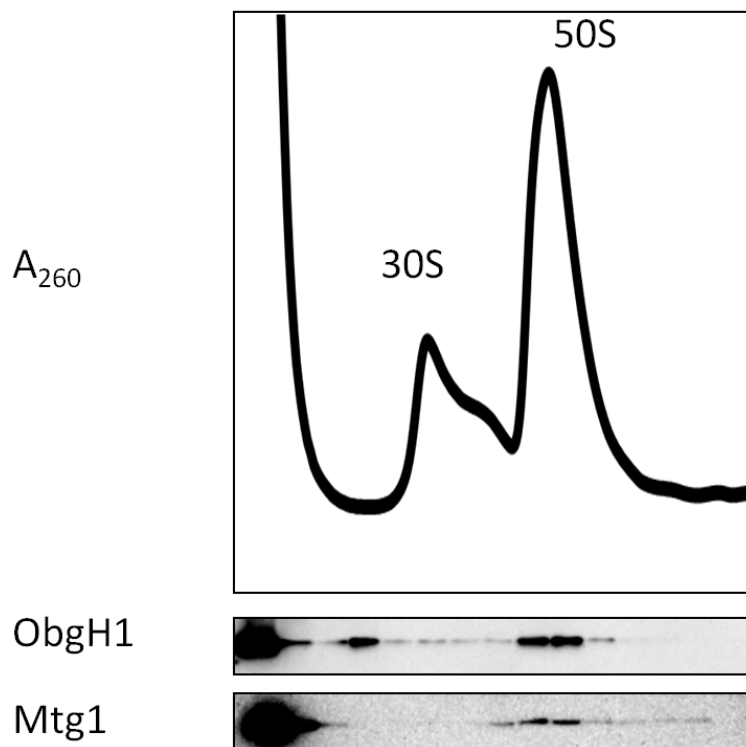


図10 GDPNP 存在下での ObgH1、Mtg1 と *E. coli* リボソームの相互作用解析

精製した 70S (f.c. 0.2 μ M) リボソームと recombinant の ObgH1 と Mtg1 (f.c. 2 μ M) を GDPNP 存在下で混合し、15-30 % (w/v) のショ糖密度勾配により分離した (39,000 rpm, 4 h, SW41Ti rotor (Beckman Coulter))。フラクションをそれぞれ ObgH1、Mtg1 に対する抗体を用いウエスタンブロッティングにより ObgH1、Mtg1 を検出した。

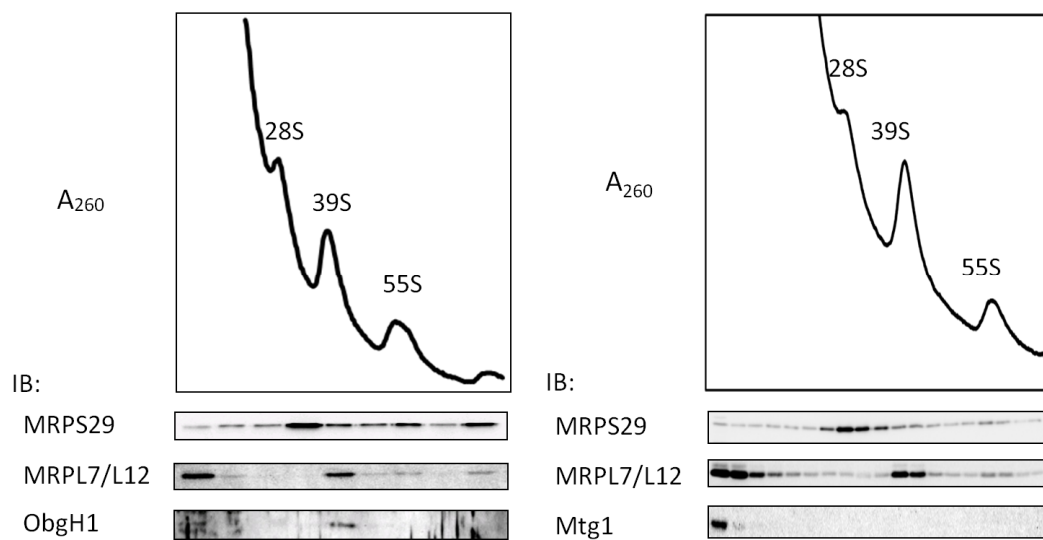


図 11 ミトコンドリア抽出液を用いた ObgH1、Mtg1 とミトコンドリアリボソームの相互作用解析

ミトコンドリアの抽出液を 10-30 % (w/v) のショ糖密度勾配により分画した(33,000 rpm, 7 h, SW41Ti rotor (Beckman Coulter))。フラクションをそれぞれ ObgH1 (左)、Mtg1 (右)に対する抗体で検出した。MRPS29: ミトコンドリアリボソームの小サブユニットのリボソームタンパク質。MRPL7/L12: ミトコンドリアリボソームの大サブユニットのリボソームタンパク質。

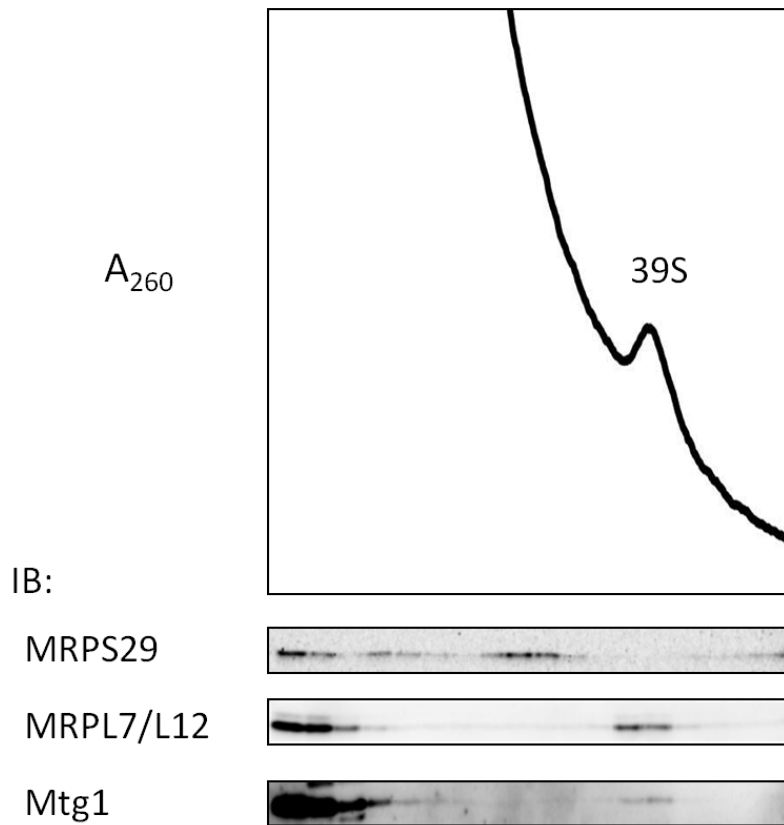


図 12 ミトコンドリア抽出液を用いた Mtg1 とミトコンドリアリボソームの相互作用解析 (GDPNP 存在下)

ミトコンドリアを GDPNP 存在下で溶解し、その抽出液を 10-30 % (w/v) のショ糖密度勾配により分画した(33,000 rpm, 7 h, SW41Ti rotor (Beckman Coulter))。フラクションをそれぞれ Mtg1 に対する抗体で検出した。MRPS29: ミトコンドリアリボソームの小サブユニットのリボソーム蛋白質。MRPL7/L12: ミトコンドリアリボソームの大サブユニットのリボソーム蛋白質。

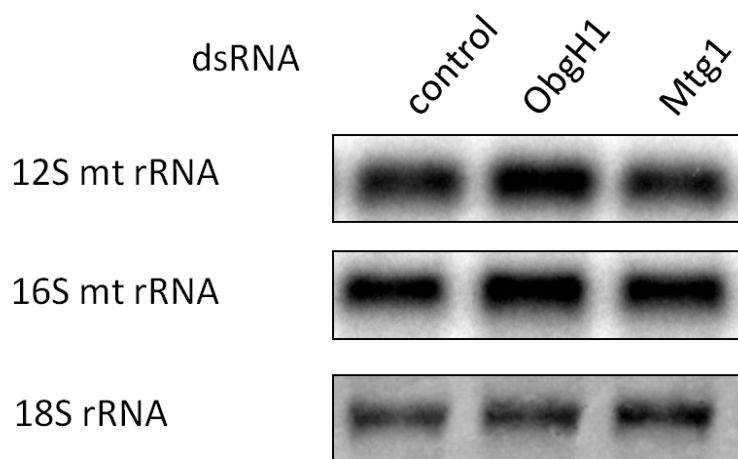


図 13 ミトコンドリアの rRNA の解析

ObgH1、Mtg1 を RNAi によりノックダウンしてから 7 日後に total RNA を回収し、1% 変性アガロースにより分離した。その後、³²P でラベルされたプローブを用いたノーザンブロッティングにより 12S、16S mt rRNA を検出した。ロードのコントロールとして細胞質の rRNA である 18S rRNA を ethidium bromide で染色した。

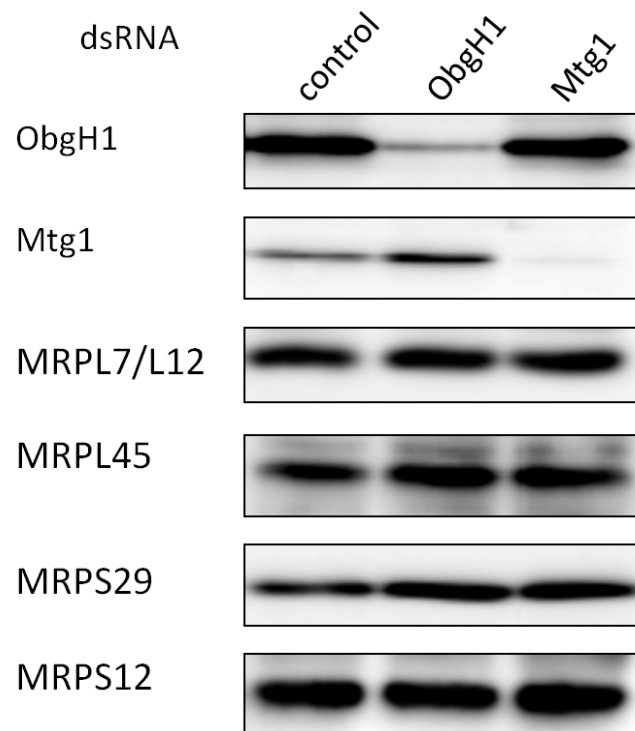


図 14 リボソーム蛋白質の解析

ObgH1、Mtg1 を RNAi によりノックダウンしてから 5 日後に細胞抽出液を調製し、それぞれのタンパク質に対する抗体を用い、ウエスタンブロッティングにより検出した。MRPL7/L12、MRPL45：ミトコンドリアリボソーム大サブユニットのリボソームタンパク質。MRPS29、MRPS12：ミトコンドリアリボソームの小サブユニットのリボソームタンパク質。

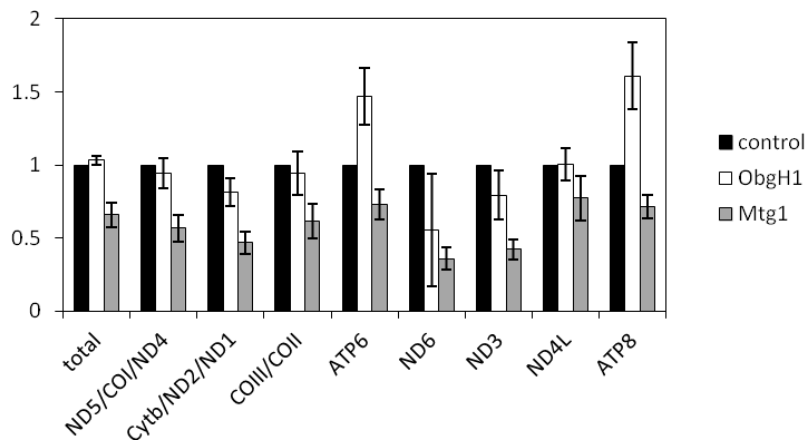
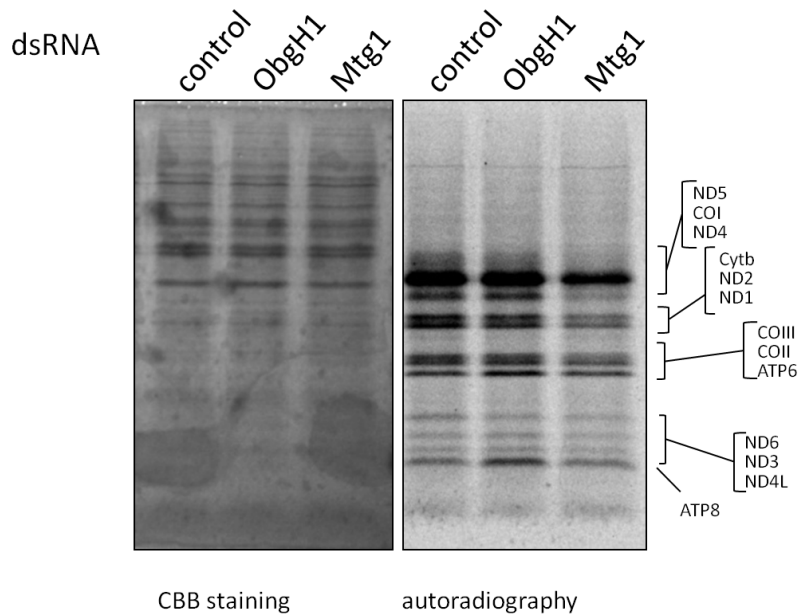


図 15 ミトコンドリアの翻訳活性の解析 (パルスラベル法)

ObgH1、Mtg1 を RNAi によりノックダウンしてから7日後の細胞に対し、emetine を加え、細胞質での翻訳を止めた。その後、 $[^{35}\text{S}]$ でラベルされた Met 入りの培地で 2h 培養し、新たにミトコンドリアで合成されたタンパク質のみをラベルした。細胞を回収したあと、細胞質のタンパク質も一緒に SDS-PAGE を行い、CBB で染色することでローディングコントロールとした。ミトコンドリアの翻訳はオートラジオグラフィーにより検出した(上)。それぞれのバンドの強度を定量し、control を 1 として示した(下)。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す。

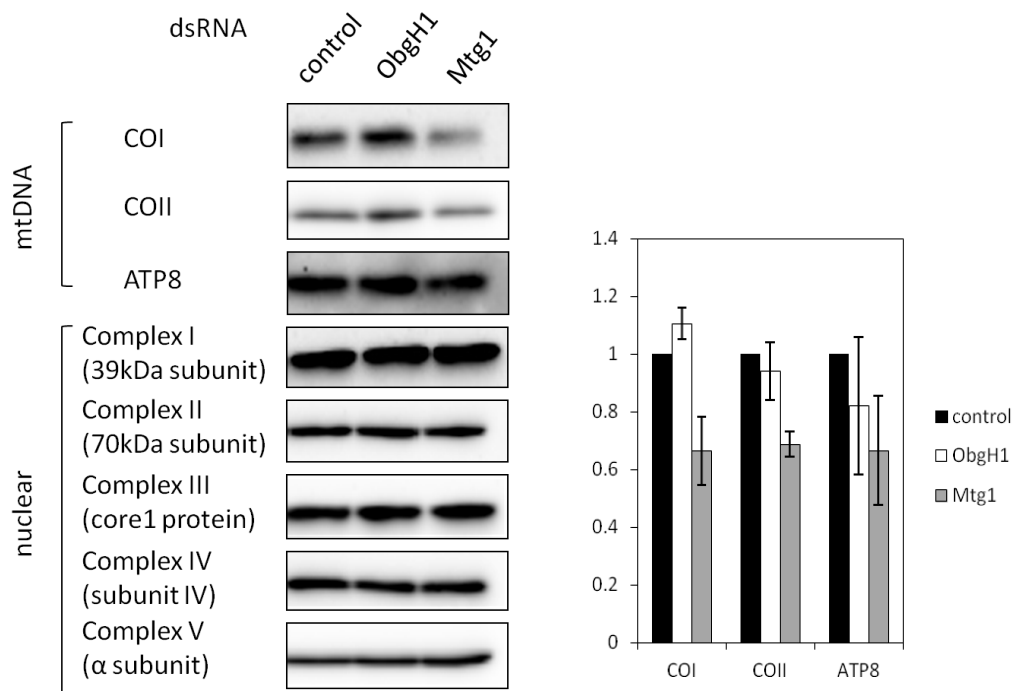


図 16 呼吸鎖複合体のサブユニットレベルの解析

ObgH1、Mtg1 を RNAi によりノックダウンしてから 5 日後の細胞の抽出液を調製し、それぞれに示す蛋白質に対する抗体による immunoblotting により蛋白質の量を解析した。COI、COII : mtDNA にコードされた Complex IV のサブユニット。ATP8 : mtDNA にコードされた Complex V のサブユニット。その他の蛋白質 : 核 DNA にコードされた呼吸鎖複合体のサブユニット(左)。mtDNA にコードされた蛋白質のバンドの強度を定量し、control の値を 1 とした時の相対値をグラフに示した(右)。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す。

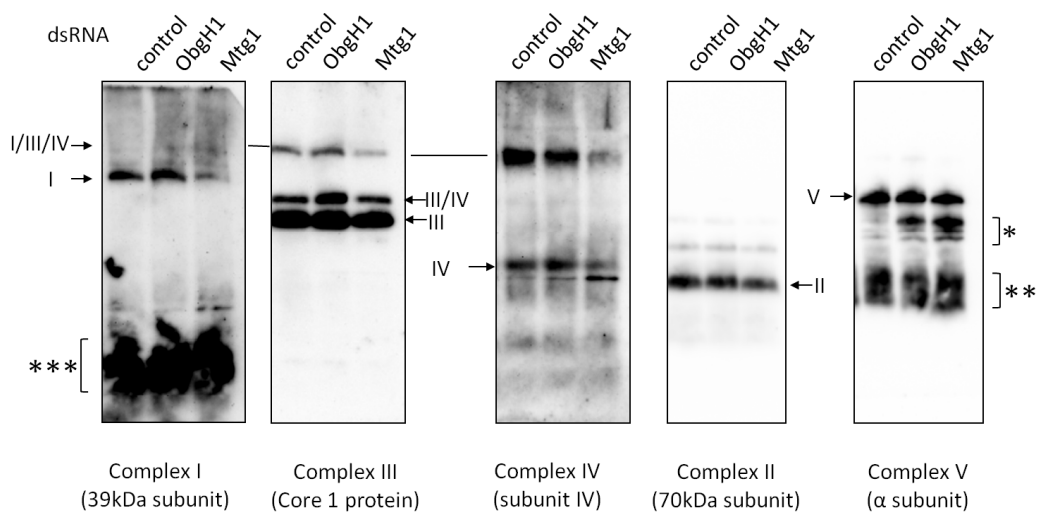


図 17 呼吸鎖複合体のアセンブリーの解析(Blue-Native PAGE)

ObgH1、Mtg1 を RNAi によりノックダウンしてから 5 日後の細胞からミトコンドリアを調製し、Digitonin で溶解した後に、Blue Native PAGE を行った。その後、核 DNA にコードされた呼吸鎖複合体のサブユニットに対する抗体による western blotting により呼吸鎖複合体のアセンブリーの解析を行った。* : Complex V の前駆体のような異常な複合体。** : Complex V の free の F1 複合体(?) *** : 非特異バンド。

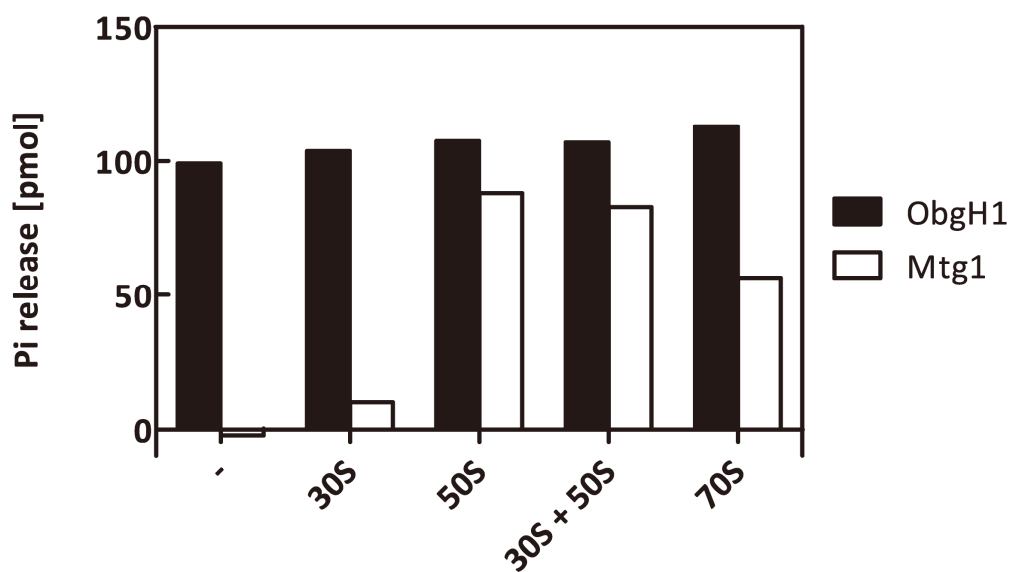


図 18 ObgH1、Mtg1 の GTPase 活性 (*E. coli* の ribosome 依存)

Recombinant の ObgH1 または Mtg1 (f.c. 4 μ M) と γ - 32 P]GTP をそれぞれ示した *E. coli* のリボソームのサブユニット (f.c. 0.2 μ M) 存在下で混合し、30 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させたあと、遊離した 32 P]Pi を測定した。

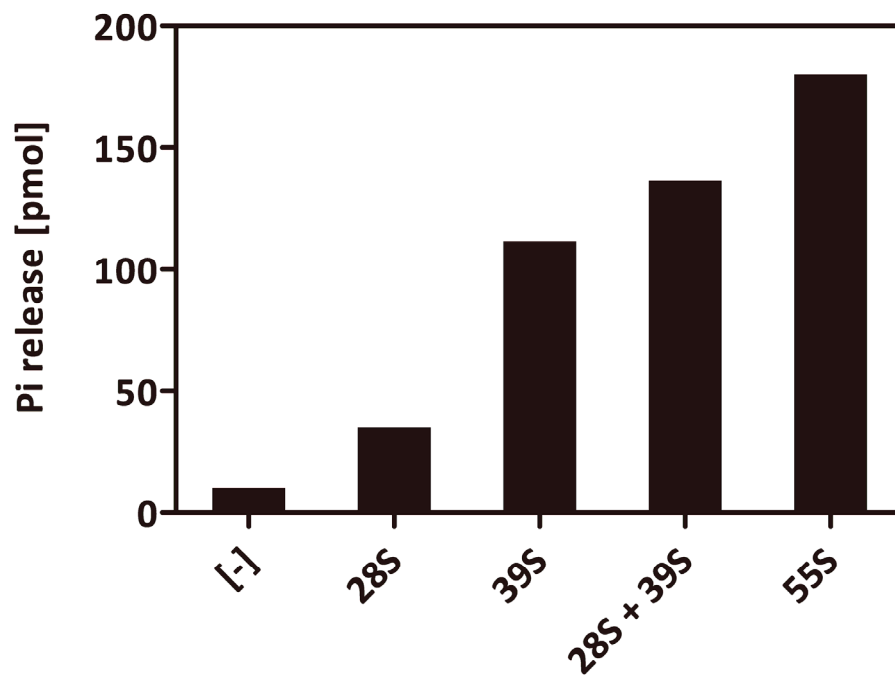


図 19 Mtg1 の GTPase 活性 (mitochondrial ribosome 依存)

Recombinant の Mtg1 (f.c. 10 μ M)と γ - 32 P]GTP をそれぞれ示したミトコンドリアリボソームのサブユニット (f.c. 0.2 μ M) 存在下で混合し、30 $^{\circ}$ Cで 20 分間反応させたあと、遊離した 32 P]Pi を測定した。

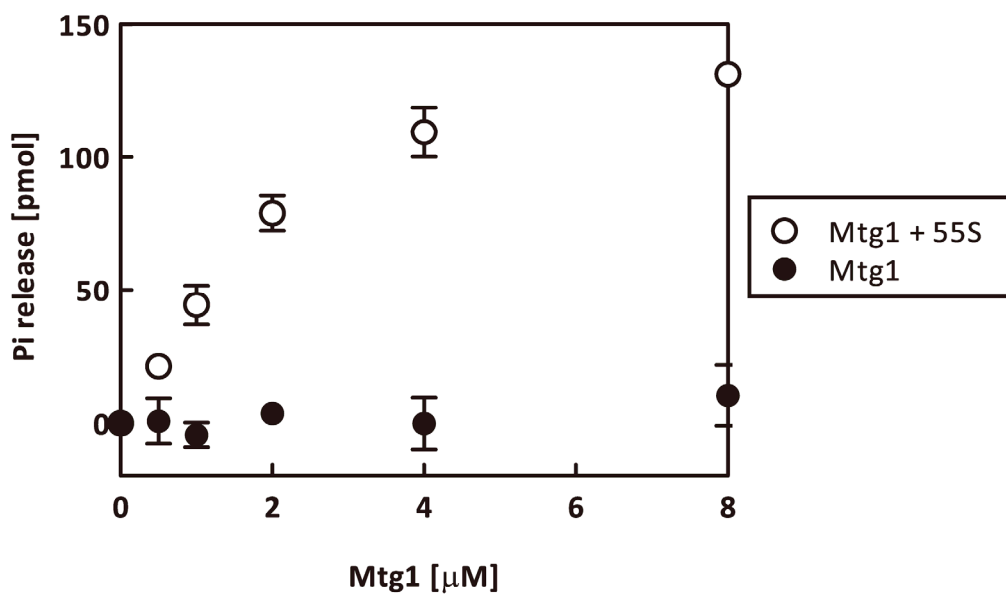


図 20 Mtg1 の GTPase 活性 (Mtg1 の量について)

Recombinant の Mtg1 (f.c. 0-8 μM)と γ - ^{32}P GTP をミトコンドリアの 55S リボソーム (f.c. 0.2 μM) の存在下で混合し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間反応させたあと、遊離した ^{32}P Pi を測定した。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す。

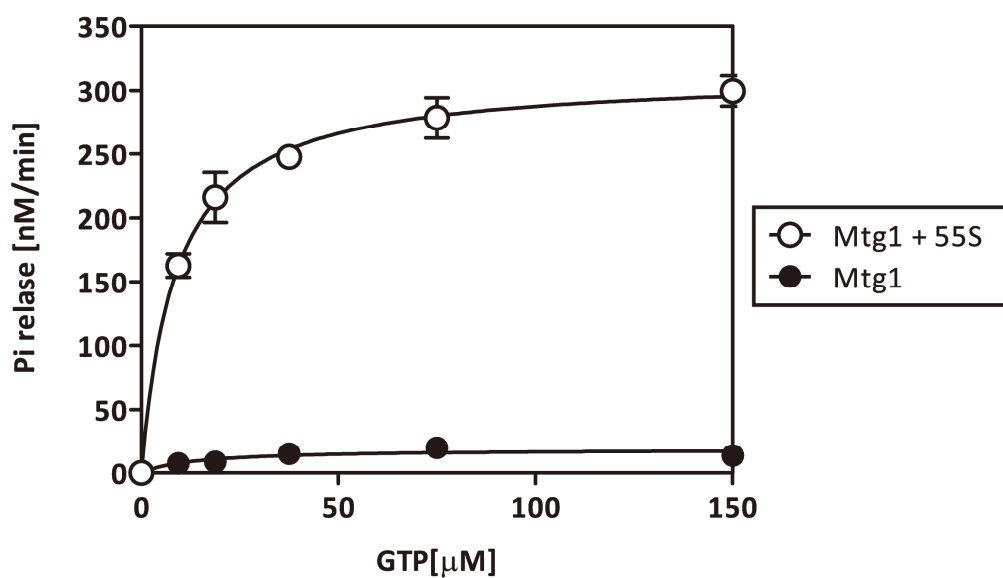


図 21 Mtg1 の GTPase 活性 (k_{cat} の決定)

Recombinant の Mtg1 (f.c. 10 μM) と γ - ^{32}P GTP (f.c. 0-150 μM) をミトコンドリアの 55S リボソーム (f.c. 0.2 μM) の存在下で混合し、30 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間反応させたあと、遊離した ^{32}P Pi を測定した。エラーバーは 3 回の実験の標準偏差を示す。

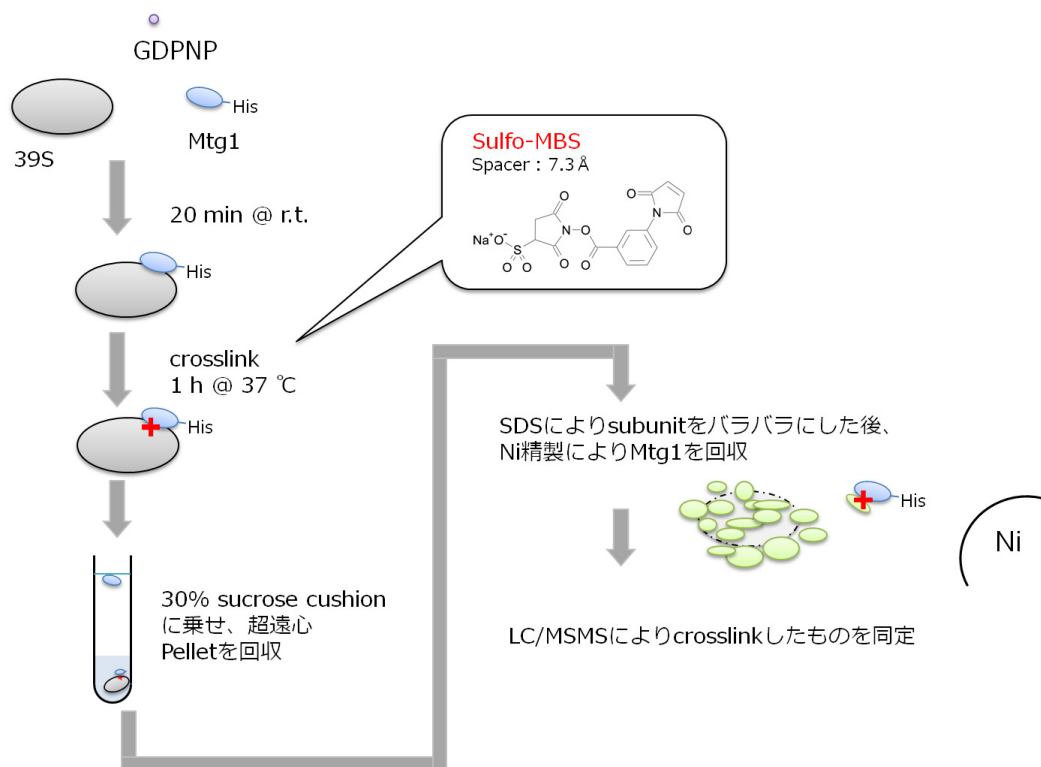


図 22 クロスリンク実験のスキーム

Mtg1 の大サブユニット上での結合部位に関する知見を得るために、クロスリンクを行った。精製した 39S 大サブユニットと His-tag 付 Mtg1 を GDPNP 存在下で混ぜ、sulfo-MBS を用いてクロスリンクした。サンプルを超遠心することで free の Mtg1 を除き、SDS により Mtg1 結合 39S 大サブユニットをバラバラにした後、Ni 精製することで Mtg1 とクロスリンクしたものを回収した。LC-MS/MS によりクロスリンクした蛋白質を同定した。

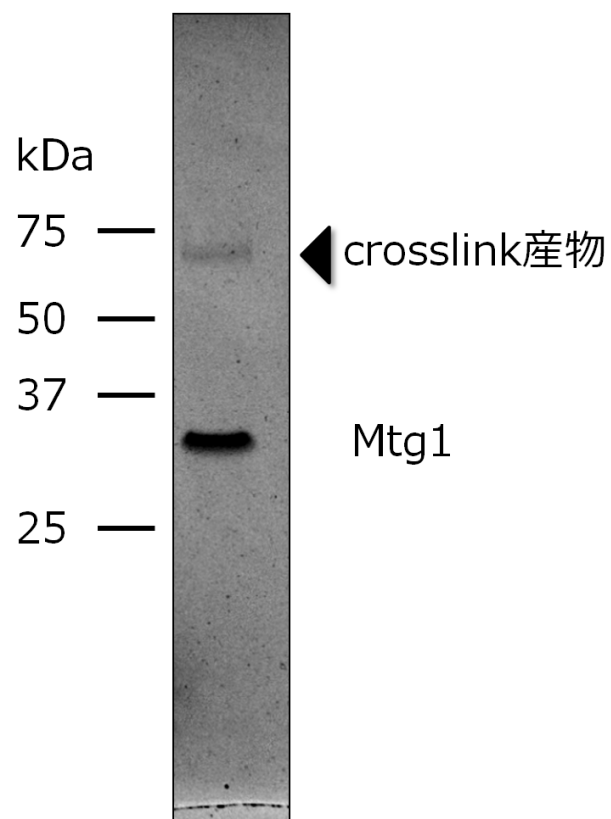


図 23 クロスリンクされたものの SDS-PAGE

Mtg1 と 39S 大サブユニットのクロスリンク実験により回収された産物を SDS-PAGE により分離し、CBB により染色した。Mtg1 がクロスリンクされて泳動度が小さくなったものバンド (arrowhead) を LC/MSMS により同定した。その結果 C10orf46 (分子量 41 kDa) が同定された。

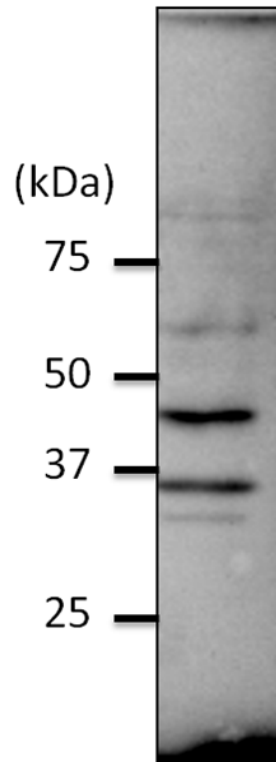
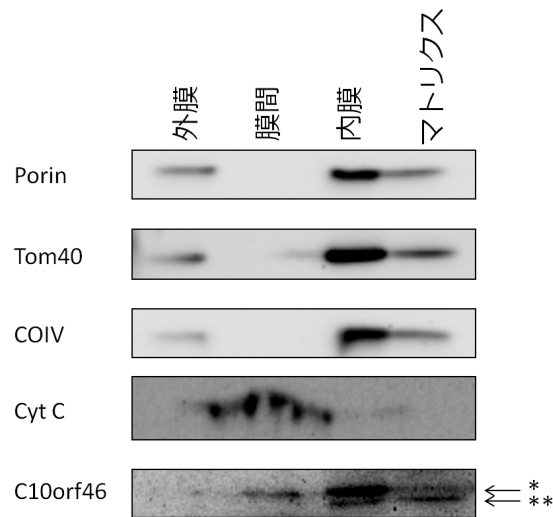


図 24 C10orf46 の発現チェック

C10orf46-myc を発現する細胞株の細胞抽出液を SDS-PAGE により分離し、myc tag に対する抗体を用いて Western blotting により C10orf46 を検出した。41 kDa 付近のバンドが全長の C10orf46 であると考えられる。35 kDa 付近のバンドは分解産物だと考えている。

(A)



(B)

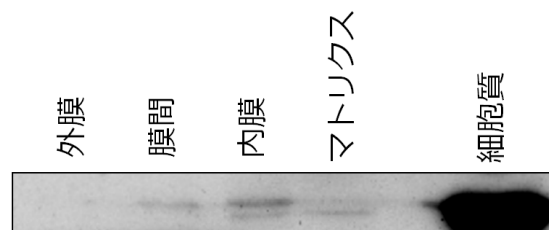


図 25 C10orf46 の局在解析

(A) C10orf46-myc を発現する細胞株からミトコンドリアを調製し、ミトコンドリアを外膜、膜間、内膜、マトリクスに分画した。それぞれのフラクションについてウェスタンブロッティングにより蛋白質を検出した。Porin、Tom40：外膜タンパク質、COIV：内膜タンパク質、cyt C：膜間タンパク質。C10orf46 は myc 抗体により検出した。*：C10orf46 のバンド。**：非特異バンド。

(B) C10orf46-myc を発現する細胞株のミトコンドリア画分と細胞質画分での C10orf46 の量の比較。ミトコンドリア画分のフラクションは 10 μ g、細胞質画分は 50 μ g ロードした。C10orf46 は myc 抗体により検出した。

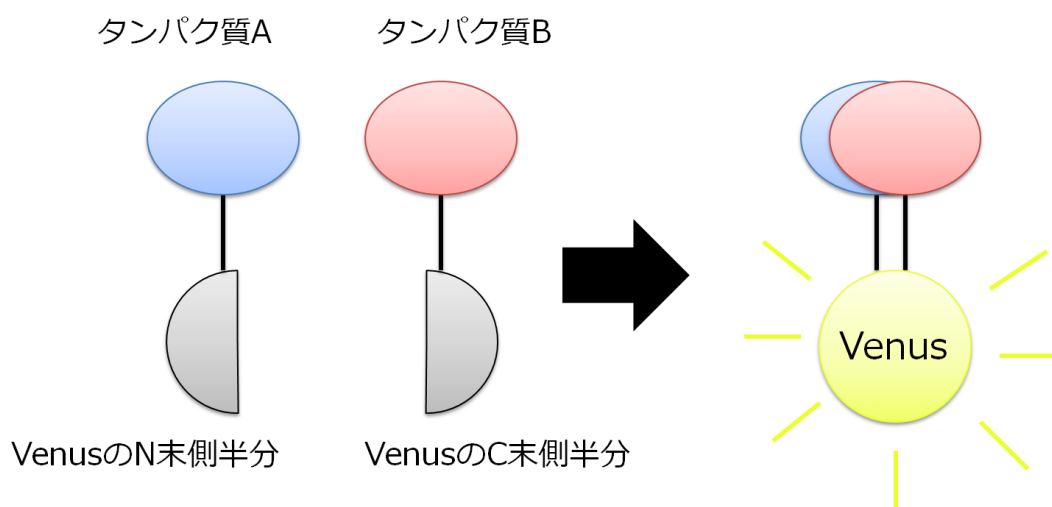
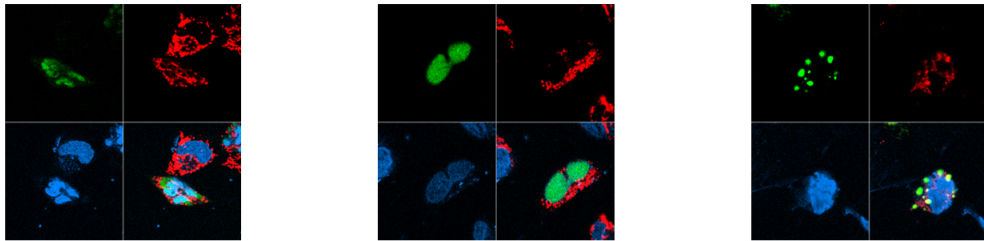


図 26 BiFC (bi-molecular fluorescent complementation)法の模式図

相互作用解析をしたい二つの蛋白質にそれぞれ Venus を 2 つに分割した N 末側半分 (VN)、C 末側半分(Vc)を融合する。二つのタンパク質が相互作用すると Venus の蛍光が発する。

(A) Mtg1_V_N + C10orf46_V_C



(B) C10orf46_V_N + Mtg1_V_C

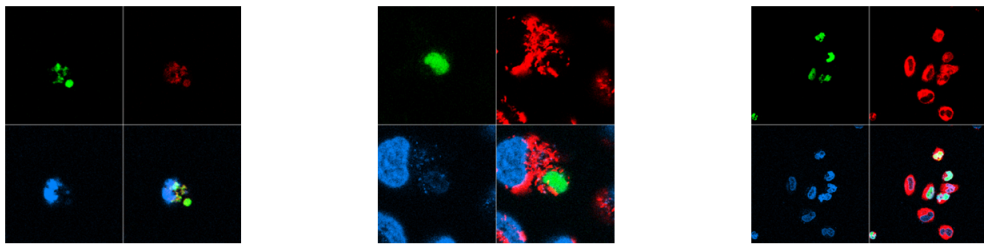


図 27 BiFC 法による C10orf46 と Mtg1 の相互作用解析

BiFC 法を用いて C10orf46 と Mtg1 がミトコンドリアで相互作用するかを解析した。HeLa 細胞に Mtg1-V_N と C10orf46-V_C (A) または C10orf46-V_N と Mtg1-V_C (B) をトランスフェクションし、共焦点顕微鏡により Venus がどこで蛍光を発するかを観察した。左上が Venus の画像。核は Hoechst 33342 で染色した(左下)。ミトコンドリアは MitoTracker Red により染色した(右上)。右下が merge した画像。

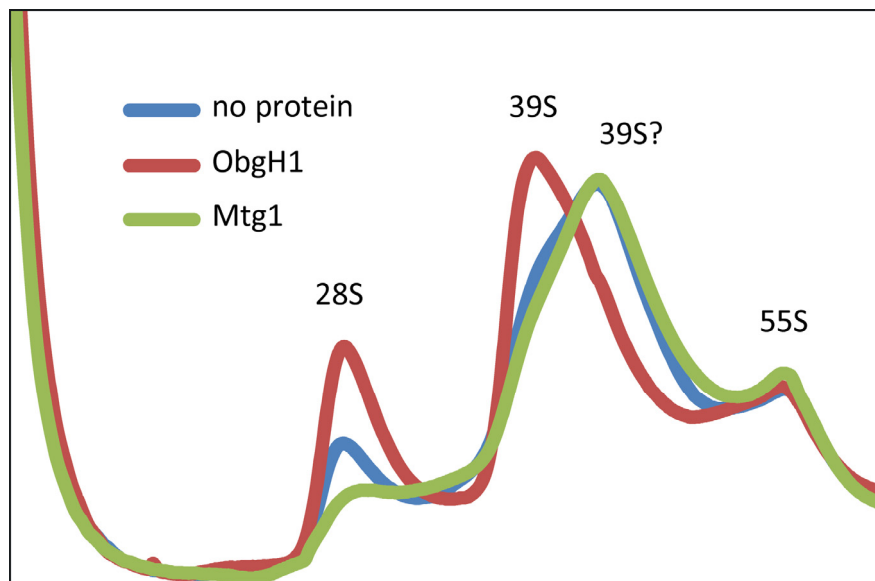


図 28 ObgH1、Mtg1 とミトコンドリアリボソームの相互作用解析

精製した 55S (f.c. 0.2 μM) リボソームと recombinant の ObgH1 (左) と Mtg1 (右) (f.c. 2 μM) を GDPNP 存在下で混合し、15-30 % (w/v) のショ糖密度勾配により分離した (39,000 rpm, 5.5 h, SW41Ti rotor (Beckman Coulter))。因子を加えなかった時、ObgH1、Mtg1 を加えた時の比較。ここでは ObgH1(72~406 amino acids) を使用したが、ObgH1(31-406 amino acids) でも同様の傾向が見られている。

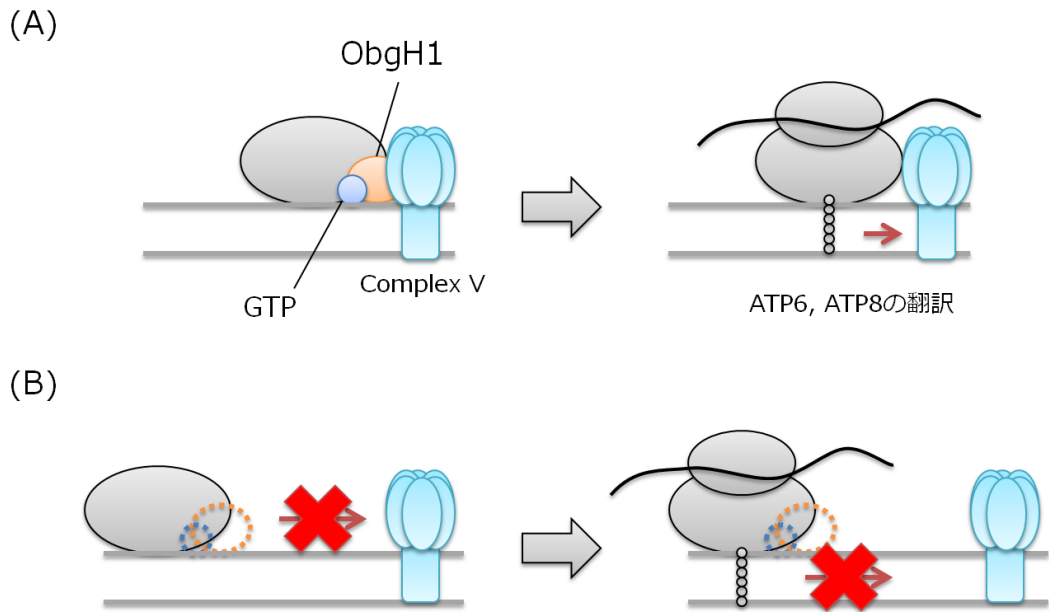


図 29 ObgH1 の作業仮説

(A) ObgH1 がある時。ObgH1 が 39S 大サブユニットを Complex V の近傍に正しく配置することで、Complex V のサブユニットである ATP6、ATP8 が Complex V の近くで翻訳され速やかにアセンブリーが起きる。

(B) ObgH1 がない時。39S 大サブユニットが正しく配置されず、ATP6、ATP8 を翻訳しても正しくアセンブリーされない。

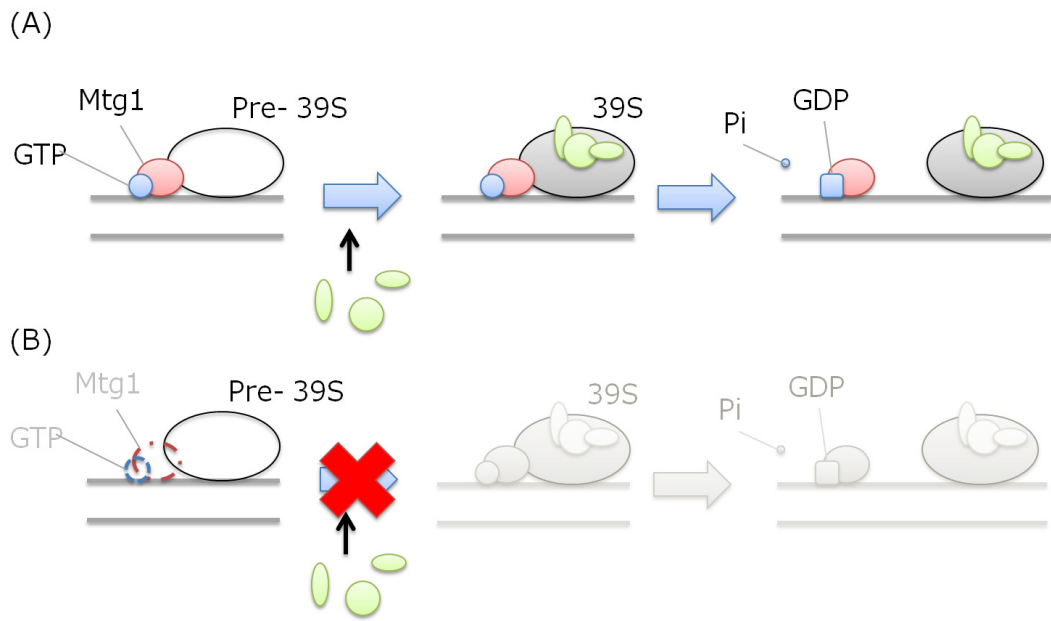


図 30 Mtg1 の作業仮説

- (A) Mtg1 がある時。Pre-39S 大サブユニットに GTP 型 Mtg1 が結合する。残りのリボソーム蛋白質蛋白質がリクルートされ大サブユニットが成熟すると、Mtg1 が GTP を加水分解し、リボソームから解離する。
- (B) Mtg1 がない時。39S 大サブユニットの生合成が途中で止まってしまう。

6. 参考文献

1. Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. **290**, 457-65.
2. Spremulli, L.L., Coursey, A., Navratil, T., and Hunter, S.E. (2004) Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. **77**, 211-61.
3. Christian, B.E. and Spremulli, L.L. (2012) Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. **1819**, 1035-54
4. Liu, M. and Spremulli L. (2000) Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem*. **275**, 29400-6.
5. Zhang, L., Ging, N.C., Komoda, T., Hanada, T., Suzuki, T., and Watanabe, K. (2005) Antibiotic susceptibility of mammalian mitochondrial translation. *FEBS Lett.* , **579**, 6423-7.
6. O'Brien, T.W. (2003) Properties of human mitochondrial ribosomes. *IUBMB Life*. **55**, 505-13
7. Kenmochi, N., Suzuki, T., Uechi, T., Magoori, M., Kuniba, M., Higa, S., Watanabe, K., and Tanaka, T. (2001) The human mitochondrial ribosomal protein genes: mapping of 54 genes to the chromosomes and implications for human disorders. *Genomics*. **77**, 65-70.
8. Miller, C., Saada, A., Shaul ,N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., Hershkovitz, E. and Elpeleg, O. (2004) Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol*. **56**, 734-8.
9. Maraganore, D.M., de Andrade, M., Lesnick, T.G., Strain, K.J., Farrer, M.J., Rocca, W.A., Pant, P.V., Frazer, K.A., Cox, D.R. and Ballinger, D.G. (2005) High-resolution whole-genome association study of Parkinson disease. *Am J Hum Genet*. **77**, 685-93.
10. Nolden, M., Ehses, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E.I. and Langer, T. (2005) The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell*. **123**, 277-89.
11. Papapetropoulos, S., Ffrench-Mullen, J., McCorquodale, D., Qin, Y., Pablo, J. and

- Mash, D.C. (2006) Multiregional gene expression profiling identifies MRPS6 as a possible candidate gene for Parkinson's disease. *Gene Expr.* **13**, 205-15.
12. Saada, A., Shaag, A., Arnon, S., Dolfin, T., Miller, C., Fuchs-Telem, D., Lombes, A. and Elpeleg, O. (2007) Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation. *J Med Genet.* **44**, 784-6.
 13. Emdadul Haque, M., Grasso, D., Miller, C., Spremulli, L.L. and Saada, A. (2008) The effect of mutated mitochondrial ribosomal proteins S16 and S22 on the assembly of the small and large ribosomal subunits in human mitochondria. *Mitochondrion.* **8**, 254-61.
 14. Galmiche, L., Serre, V., Beinat, M., Assouline, Z., Lebre, A.S., Chretien, D., Nietschke, P., Benes, V., Boddaert, N., Sidi, D., Brunelle, F., Rio, M., Munnich, A. and Rötig, A. (2011) Exome sequencing identifies MRPL3 mutation in mitochondrial cardiomyopathy. *Hum Mutat.* **32**, 1225-31.
 15. Carroll, C.J., Isohanni, P., Pöyhönen, R., Euro, L., Richter, U., Brilhante, V., Götz, A., Lahtinen, T., Paetau, A., Pihko, H., Battersby, B.J., Tyynismaa, H., and Suomalainen, A. (2013) Whole-exome sequencing identifies a mutation in the mitochondrial ribosome protein MRPL44 to underlie mitochondrial infantile cardiomyopathy. *J Med Genet.* [Epub ahead of print]
 16. Leipe, D.D., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol.* **317**, 41-72.
 17. Shajani, Z., Sykes, M.T., and Williamson, J.R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem.* **80**, 501-26.
 18. Britton, R.A. (2009) Role of GTPases in bacterial ribosome assembly. *Annu Rev Microbiol.* **63**, 155-76.
 19. Bunner, A.E., Nord, S., Wikström, P.M., and Williamson, J.R. (2010) The effect of ribosome assembly cofactors on in vitro 30S subunit reconstitution. *J Mol Biol.* **398**, 1-7.
 20. Goto, S., Kato, S., Kimura, T., Muto, A., and Himeno, H. (2011) RsgA releases RbfA from 30S ribosome during a late stage of ribosome biosynthesis. *EMBO J.* **30**, 104-14.
 21. Barrientos, A., Korr, D., Barwell, K.J., Sjulsen, C., Gajewski, C.D., Manfredi, G., Ackerman, S. and Tzagoloff, A. (2003). MTG1 Codes for a Conserved Protein Required for Mitochondrial Translation. *Mol Biol Cell.* **14**, 2292-2302.
 22. Datta, K., Fuentes, J.L. and Maddock, J.R. (2005) The yeast GTPase Mtg2p is required for mitochondrial translation and partially suppresses an rRNA

- methyltransferase mutant, *mrm2*. *Mol Biol Cell*. **16**, 954-63.
23. Paul, M.F., Alushin, G.M., Barros, M.H., Rak, M. and Tzagoloff, A. (2012) The putative GTPase encoded by MTG3 functions in a novel pathway for regulating assembly of the small subunit of yeast mitochondrial ribosomes. *J Biol Chem*. **287**, 24346-55.
 24. Wanschers, B.F., Szklarczyk, R., Pajak, A., van den Brand, M.A., Gloerich, J., Rodenburg, R.J., Lightowlers, R.N., Nijtmans, L.G. and Huynen, M.A. (2012) C7orf30 specifically associates with the large subunit of the mitochondrial ribosome and is involved in translation. *Nucleic Acids Res*. **40**, 4040-51.
 25. Rorbach, J., Gammage, P.A. and Minczuk, M. (2012) C7orf30 is necessary for biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Nucleic Acids Res*. **40**, 4097-109.
 26. Fung, S., Nishimura, T., Sasarman, F. and Shoubridge, E.A. (2012) The conserved interaction of C7orf30 with MRPL14 promotes biogenesis of the large mitochondrial ribosomal subunit and mitochondrial translation. *Mol Biol Cell*. [Epub ahead of print]
 27. Uchiumi, T., Ohgaki, K., Yagi, M., Aoki, Y., Sakai, A., Matsumoto, S. and Kang, D. (2010) ERAL1 is associated with mitochondrial ribosome and elimination of ERAL1 leads to mitochondrial dysfunction and growth retardation. *Nucleic Acids Res*. **38**, 5554-68
 28. Dennerlein, S., Rozanska, A., Wydro, M., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. and Lightowlers, R.N. (2010) Human ERAL1 is a mitochondrial RNA chaperone involved in the assembly of the 28S small mitochondrial ribosomal subunit. *Biochem J*. **430**, 551-8.
 29. He, J., Cooper, H.M., Reyes, A., Di Re, M., Kazak, L., Wood, S.R., Mao, C.C., Fearnley, I.M., Walker, J.E. and Holt, I.J. (2012) Human C4orf14 interacts with the mitochondrial nucleoid and is involved in the biogenesis of the small mitochondrial ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res*. **40**, 6097-108.
 30. Hirano, Y., Ohniwa, R.L., Wada, C., Yoshimura, S.H. and Takeyasu, K. (2006) Human small G proteins, ObgH1, and ObgH2, participate in the maintenance of mitochondria and nucleolar architectures. *Genes Cells*. **11**, 1295-304.
 31. Sato, A., Kobayashi, G., Hayashi, H., Yoshida, H., Wada, A., Maeda, M., Hiraga, S.,

- Takeyasu, K. and Wada, C. (2005) The GTP binding protein Obg homolog ObgE is involved in ribosome maturation. *Genes Cells*. **10**, 393-408.
32. Jiang, M., Datta, K., Walker, A., Strahler, J., Bagamasbad, P., Andrews, P.C. and Maddock, J.R. (2006) The Escherichia coli GTPase CgtAE is involved in late steps of large ribosome assembly. *J Bacteriol*. **188**, 6757-70.
33. Scott, J.M., Ju, J., Mitchell, T. and Haldenwang, W.G. (2000) The Bacillus subtilis GTP binding protein obg and regulators of the sigma(B) stress response transcription factor cofractionate with ribosomes. *J Bacteriol*. **182**, 2771-7.
34. Tan, J., Jakob, U. and Bardwell, J.C. (2002) Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase. *J Bacteriol*. **184**, 2692-8.
35. Matsuo, Y., Morimoto, T., Kuwano, M., Loh, P.C., Oshima, T. and Ogasawara, N. (2006) The GTP-binding protein YlqF participates in the late step of 50 S ribosomal subunit assembly in Bacillus subtilis. *J Biol Chem*. **281**, 8110-7.
36. Schaefer, L., Uicker, W.C., Wicker-Planquart, C., Foucher, A.E., Jault, J.M. and Britton, R.A. (2006) Multiple GTPases participate in the assembly of the large ribosomal subunit in Bacillus subtilis. *J Bacteriol*. **188**, 8252-8.
37. Uicker, W.C., Schaefer, L. and Britton, R.A. (2006). The essential GTPase RbgA (YlqF) is required for 50S ribosome assembly in Bacillus subtilis. *Mol Microbiol*. **59**, 528-40.
38. Matsuo, Y., Oshima, T., Loh, P.C., Morimoto, T., and Ogasawara, N. (2007). Isolation and characterization of a dominant negative mutant of Bacillus subtilis GTP-binding protein, YlqF, essential for biogenesis and maintenance of the 50 S ribosomal subunit. *J Biol Chem*. **282**, 25270-7.
39. Achila, D., Gulati, M., Jain, N., and Britton, R.A. (2012) Biochemical characterization of ribosome assembly GTPase RbgA in Bacillus subtilis. *J Biol Chem*. **287**, 8417-23.
40. Spremulli, L.L. (2007) Large-scale isolation of mitochondrial ribosomes from mammalian tissues. *Methods Mol Biol*. **372**, 265-75.
41. Suzuki, T., Terasaki, M., Takemoto-Hori, C., Hanada, T., Ueda, T., Wada, A. and Watanabe, K. (2001) Structural compensation for the deficit of rRNA with proteins in the mammalian mitochondrial ribosome. Systematic analysis of protein components of the large ribosomal subunit from mammalian mitochondria. *J Biol Chem*. **276**,

- 21724-36.
42. Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B.W., and Ueda, T. (2007) Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components. *Biochem Biophys Res Commun.* **352**, 270-6.
 43. Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* **9**, 789-98.
 44. Lin, B., Thayer, D.A. and Maddock, J.R. (2004) The *Caulobacter crescentus* CgtAC protein cosediments with the free 50S ribosomal subunit. *J Bacteriol.* **186**, 481-9.
 45. Schägger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777-83.
 46. Lin, B., Covalle, K.L. and Maddock, J.R. (1999) The *Caulobacter crescentus* CgtA protein displays unusual guanine nucleotide binding and exchange properties. *J Bacteriol.* **181**, 5825-32.
 47. Im, C.H., Hwang, S.M., Son, Y.S., Heo, J.B., Bang, W.Y., Suwastika, I.N., Shiina, T. and Bahk, J.D. (2011). Nuclear/nucleolar GTPase 2 proteins as a subfamily of YlqF/YawG GTPases function in pre-60S ribosomal subunit maturation of mono- and dicotyledonous plants. *J Biol Chem.* **286**, 8620–32.
 48. Gruschke, S., Gröne, K., Heublein, M., Hölz, S., Israel, L., Imhof, A., Herrmann, J.M. and Ott, M. (2010) Proteins at the polypeptide tunnel exit of the yeast mitochondrial ribosome. *J Biol Chem.* **285**, 19022-8
 49. Kong, Y., Nan, K. and Yin, Y. (2009) Identification and characterization of CAC1 as a novel CDK2-associated cullin. *Cell Cycle.* **8**, 3544-53.
 50. Kong, Y., Bai, P.S., Sun, H. and Nan, K.J. (2012) Expression of the newly identified gene CAC1 in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J Mol Neurosci.* **47**, 207-18.
 51. Lafontaine, D.L., and Tollervey, D. (2001) The function and synthesis of ribosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**, 514-20.
 52. Rorbach, J., and Minczuk, M. (2012) The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochem J.* **444**, 357-73.
 53. Rak, M. and Tzagoloff, A. (2009) F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 18509-14.

54. Bauerschmitt, H., Mick, D.U., Deckers, M., Vollmer, C., Funes, S., Kehrein, K., Ott, M., Rehling, P. and Herrmann, J.M. (2010) Ribosome-binding proteins Mdm38 and Mba1 display overlapping functions for regulation of mitochondrial translation. *Mol Biol Cell.* **21**, 1937-44.
55. Heidler, J., Al-Furoukh, N., Kukat, C., Salwig, I., Ingelmann, M.E., Seibel, P., Krüger, M., Holtz, J., Wittig, I., Braun, T. and Szibor, M. (2011) Nitric oxide-associated protein 1 (NOA1) is necessary for oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiratory complexes. *J Biol Chem.* **286**, 32086-93.
56. Datta, K., Skidmore, J.M., Pu, K. and Maddock, J.R. (2004) The *Caulobacter crescentus* GTPase CgtAC is required for progression through the cell cycle and for maintaining 50S ribosomal subunit levels. *Mol Microbiol.* **54**, 1379-92.
57. Foti, J.J., Persky, N.S., Ferullo, D.J. and Lovett, S.T. (2007) Chromosome segregation control by *Escherichia coli* ObgE GTPase. *Mol Microbiol.* **65**, 569-81.
58. He, J., Cooper, H.M., Reyes, A., Di Re, M., Sembongi, H., Litwin, T.R., Gao, J., Neuman, K.C., Fearnley, I.M., Spinazzola, A., Walker, J.E. and Holt, I.J. (2012) Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* **40**, 6109-21.
59. Herold, M., and Nierhaus, K.H. (1987) Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J Biol Chem.* **262**, 8826-33.
60. Kaczanowska, M., and Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome biogenesis and the translation process in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **71**, 477-94.

7. 謝辞

指導教官である富田野乃准教授に深く感謝申し上げます。学部4年生の時から6年間、直接の指導をしていただきました。研究がうまくいかないことも多かったですが、なんとかここまでたどり着けたのも富田野乃准教授のおかげだと思っています。ありがとうございました。

上田卓也教授には自由に研究できる雰囲気を作ってください大変感謝しています。非常に実験しやすく、研究に没頭できました。また研究会などでは多くの指摘やアドバイスをしていただき感謝しています。

京都大学大学院生命科学研究科の竹安邦夫教授には ObgH1 の発現プラスミドを御供与頂きましたことを感謝申し上げます。

周站平博士には *E. coli* の 50S、30S リボソームを頂きました。ありがとうございました。また、後輩の赤羽しおりさんには貴重な 55S ミトコンドリアリボソームや proteinase K 解析のサンプルを頂きました。ありがとうございました。

分子医科学分野のみなさまにも感謝申し上げます。研究のことだけでなく、研究以外のところでも大変お世話になりました。分子医科学分野での6年間、大変楽しく過ごすことができました。ありがとうございました。