

博士論文

哺乳類ミトコンドリアにおける
異常停止したリボソーム複合体の解消機構
(ICT1 の機能解析)

赤羽 しおり

博士学位論文

哺乳類ミトコンドリアにおける
異常停止したリボソーム複合体の解消機構
(ICT1 の機能解析)

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
指導教官：富田 野乃 准教授

赤羽 しおり

目次

1	背景	6
1.1	哺乳類ミトコンドリアにおけるタンパク質合成系	6
1.2	翻訳終結過程におけるペプチド解離	9
1.3	大腸菌における異常停止したリボソーム複合体の解消機構	12
1.4	哺乳類ミトコンドリアにおけるペプチド解離因子	15
1.5	ICT1	16
1.5.1	哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳の異常停止	16
1.5.2	ICT1 の同定	16
1.5.3	ICT1/ArfB の構造と生化学的解析	17
1.5.4	ICT1/ArfB の C-tail 領域	17
1.5.5	リボソームタンパク質としての ICT1	18
1.5.6	ICT1/ArfB の作用機序に関する疑問	19
2	実験手法	21
2.1	ミトコンドリア 55S リボソームの調製	21
2.2	55S リボソームのショ糖密度勾配による分画	21
2.3	ヒト由来 ICT1 の発現・精製	22
2.4	RF2-ICT1 α 2 変異体の発現・精製	22
2.5	<i>in vitro</i> 55S peptide release assay	23
2.6	<i>in vitro</i> multi-round translation assay	24
2.7	Polysome Breakdown Assay	25
2.8	膜挿入と共役した <i>in vitro</i> translation assay	25
2.9	ribosome/ICT1 binding assay	26
2.10	クロスリンク解析	26

2.11	Western blotting 解析	26
3	結果	28
3.1	ミトコンドリア 55S リボソームにおける ICT1 の機能解析	28
3.1.1	55S リボソームの Western blotting 解析	28
3.1.2	mRNA 存在下における <i>in vitro</i> 55S peptide release assay	29
3.1.3	mRNA 非存在下における <i>in vitro</i> peptide release assay	31
3.1.3.1	<i>in vitro</i> 55S peptide release assay (mRNA 非存在下)	31
3.1.3.2	<i>in vitro</i> 70S peptide release assay (mRNA 非存在下)	32
3.1.4	55S リボソームにおける内在性 ICT1 と外来因子の結合競合性解析	33
3.1.4.1	His-ICT1 の 55S リボソームへの結合解析	33
3.1.4.2	A-site 結合翻訳因子の 55S リボソームへの結合解析	34
3.1.5	外来 ICT1 のリボソームサブユニットへの結合解析	36
3.1.6	ICT1/ArfB の細胞内局在解析	38
3.1.7	ミトコンドリア 55S リボソームにおける ICT1 の機能解析のまとめ	39
3.2	ICT1 が基質とする異常停止の特徴	40
3.2.1	<i>in vitro</i> multi-round translation assay	40
3.2.1.1	ICT1 の基質特異性解析	40
3.2.1.2	ICT1 は通常の翻訳を阻害しない	43
3.2.1.3	ICT1 C-tail 領域の基質特異性に与える影響	44
3.2.1.4	連続したプロリン配列による異常停止に対する ICT1 の機能解析	45
3.2.2	polysome breakdown assay	48
3.2.3	70S リボソームにおける ICT1 の結合部位解析	49
3.2.4	膜挿入途中の異常停止における ICT1 の機能	50
3.2.5	ICT1 が基質とする異常停止の特徴のまとめ	53
3.3	ICT1 の機能部位解析	53
3.3.1	ICT1 / ArfB 特異的 25 残基挿入領域	53
3.3.2	ICT1 挿入領域変異体のペプチド解離能解析	56
3.3.2.1	<i>in vitro</i> 55S peptide release assay	56

3.3.2.2	<i>in vitro</i> multi-round translation assay	58
3.3.3	ICT1 挿入領域変異体のリボソーム結合能解析	61
3.3.3.1	Western blotting による ICT1 挿入領域変異体のリボソーム結合能解析	61
3.3.3.2	ミトコンドリア 55S リボソームと ICT1 のクロスリンク解析	64
3.3.4	RF2-ICT1α2 変異体の解析	65
3.3.5	ICT1 の機能部位解析のまとめ	67
4	考察	68
4.1	ミトコンドリアにおける ICT1 の作用機序	68
4.1.1	異常停止解消における ICT1 の機能	68
4.1.1.1	異常停止解消における ICT1 の作用機序モデル	68
4.1.1.2	39S 大サブユニットの CryoEM 構造における ICT1 の結合部位	71
4.1.1.3	mRNA 非存在下の異常停止	73
4.1.2	翻訳終結における機能	74
4.2	リボソームタンパク質としての ICT1 の生理的意義	76
4.3	ICT1 が基質とする異常停止の特徴について	78
4.3.1	<i>in vitro</i> multi-round translation assay	78
4.3.1.1	<i>in vitro</i> multi-round translation assay における ICT1 の機能解析	78
4.3.1.2	連続したプロリン配列による異常停止に対する ICT1 の機能解析	78
4.3.2	70S リボソームにおける ICT1 の結合部位の解析	79
4.3.3	膜挿入途中の異常停止における ICT1 の機能	80
4.4	ICT1/ArfB の挿入領域の役割	80
4.4.1	ICT1 挿入領域のリボソームとの相互作用部位	81
4.4.2	挿入領域の ArfA としての機能	82
4.4.3	挿入領域変異体のクロスリンク反応によるリボソームとの相互作用解 析	83
4.5	RF1mt の機能	83
4.6	哺乳類ミトコンドリアのペプチド解離因子	84
5	結論	86

6 参考文献	87
7 謝辞	94

1 背景

1.1 哺乳類ミトコンドリアにおけるタンパク質合成系

ミトコンドリアはほとんどの真核生物に存在する細胞小器官であり、ヒトにおいては赤血球以外の全細胞に存在する。外膜と内膜の二重膜構造を持ち、内膜に存在する電子伝達系および ATP 合成酵素を介して ATP を合成する。細胞のエネルギー産出の大部分を担っており、哺乳類細胞では全エネルギー産出のうち約 90%以上がミトコンドリア由来となっている (Christian and Spremulli, 2012)。

ミトコンドリア二重膜の内側には、核とは別の独自のゲノム DNA (mtDNA) が存在する。哺乳類ミトコンドリアの mtDNA は 16.5kbp の環状 DNA であり、細胞当たり数百から数千コピー存在する。mtDNA には 13 種のタンパク質、22 種の tRNA、2 種の rRNA がコードされており、このうち 13 個のタンパク質は全て、ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖複合体を形成する膜タンパク質となっている (図 1)。一方で、ミトコンドリア内膜の呼吸鎖複合体を形成するタンパク質の大部分は核ゲノムにコードされており、細胞質で合成された後、ミトコンドリアに輸送され、内膜に挿入される。したがって内膜の呼吸鎖複合体は、mtDNA 由来タンパク質と核ゲノム由来のタンパク質が組み合わさることで形成される。

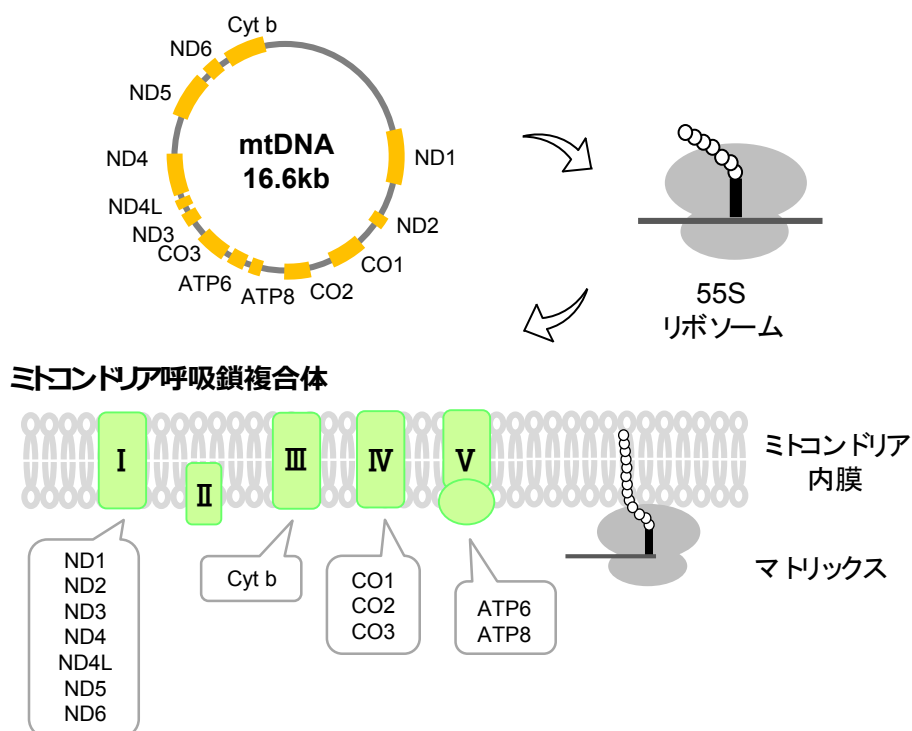


図1 ミトコンドリアには独自のタンパク質合成系が存在する

mtDNA にコードされた 13 個のタンパク質は、ミトコンドリア独自の転写・翻訳系によってタンパク質に合成され、内膜に挿入される。哺乳類ミトコンドリアでは、タンパク質合成系に必要な tRNA、およびリボソームを構成する rRNA は全て、mtDNA にコードされており、ミトコンドリア内で転写される。一方で翻訳因子やリボソームタンパク質は全て核ゲノムにコードされており、細胞質で合成された後、ミトコンドリアに輸送される。

生体内におけるタンパク質合成は、開始、伸長、終結、リボソーム再生の 4 つの過程から成る。ミトコンドリアの由来は α プロテオバクテリアであると言われているように、そのタンパク質合成系は原核生物型となっており、各過程において、原核生物にホモロジーを持つ様々な翻訳因子が機能する (図 2)。しかし多くの点において、原核生物とも真核生物細胞質とも異なる特徴を持っており、以下にその詳細を述べる。

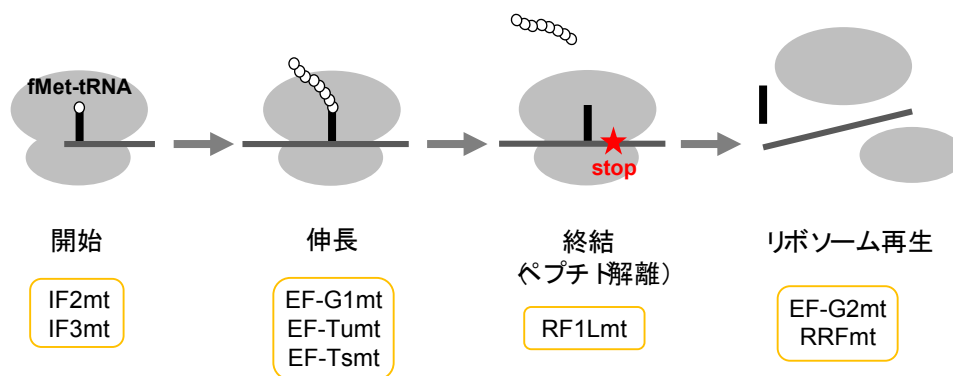


図2 哺乳類ミトコンドリアにおけるタンパク質合成の4つの過程
各過程に関与する翻訳因子が示されている。

(a) ミトコンドリア遺伝暗号表

通常、原核生物において終止コドンに対応する UGA コドンは、哺乳類ミトコンドリアではトリプトファンをコードし、イソロイシンをコードする AUA コドンはメチオニンをコードする。さらに、AGA、AGG コドンに対応する tRNA は存在しない。このため、これらは長い間終止コドンとして考えられているが、現在のところ、AGA/G を認識する翻訳終結因子は見つかっておらず、AGA/G における翻訳終結機構は明らかになっていない (Soleimanpour-Lichaei et al., 2007; Nozaki et al., 2008)。

(b) mRNA

哺乳類ミトコンドリアの mRNA は 5'UTR (5' untranslated region) を持たず、5'末端が AUG の開始コドンとなっている (Temperley et al., 2010b)。原核生物の mRNA は通常、開始コドン上流にリボソームとの相互作用に重要な SD 配列 (shine-dalgarno sequence) を持つが、ミトコンドリア mRNA には SD 配列は存在せず、これと一致して、ミトコンドリア 55S リボ

ソーム側にも、SD 配列と相互作用するアンチ SD 配列が存在しない。また mRNA の 3'UTR には真核生物 mRNA と同様に 40~50 ヌクレオチド程の poly(A)が存在する。13 種の mtDNA コードタンパク質のうち、約半分の遺伝子はその ORF (open reading frame) に終止コドンを持たないが、ミトコンドリア由来 poly(A) polymerase (mtPAP) によって poly(A)が付加されることで完全な終止コドン UAA/AGA が出現する (Nagaike et al., 2005)。

(c) tRNA

通常、原核生物には 30 種類以上の tRNA が存在するのに対して、哺乳類ミトコンドリアでは mtDNA にコードされた 22 種の tRNA のみが存在し、60 種類のコドンをデコードする。ミトコンドリア tRNA は、通常の tRNA と比較して全体的に短く、クローバーリーフ構造を取らないものや、L 字構造形成に重要とされる保存されたヌクレオチドを欠いているものなど、通常の tRNA とは配列および構造の点で大きく異なる (Suzuki et.al., 2011; Christian and Spremulli, 2012)。

(d) リボソーム

ミトコンドリアリボソーム (55S) は細菌 (70S) や真核生物細胞質 (80S) のリボソームと比較して、RNA 成分とタンパク質成分の比率が逆になっており、RNA 成分が少なくタンパク質成分が多くなっている。そのため 55S の低い沈降係数を持つ。2 個の ribosomal RNA (12S、16S) と約 80 個のタンパク質から成っており、28S 小サブユニットと 39S 大サブユニットから構成される。rRNA は全て mtDNA にコードされているのに対し、リボソームタンパク質は全て核ゲノムにコードされ、細胞質でタンパク質に合成された後ミトコンドリアに輸送される。約半分のリボソームタンパク質は大腸菌オーソログを持たずミトコンドリア特異的なものとなっており、また、大腸菌オーソログを持つタンパク質の多くはそのカウンターパートよりかなり大きい。ミトコンドリアリボソームにおいて、減少した rRNA 成分は増加したタンパク質成分によって多少補われてはいるが、ミトコンドリア特異的リボソームタンパク質のうち、欠失した rRNA 成分を補うのは約 20%のみである。リボソームタンパク質の多くは、ミトコンドリアリボソーム特異的な配置をとっており、このため特徴的な空洞やリボソーム表面構造が形成されている (Christian and Spremulli, 2012; Rackham et al., 2013)。

ミトコンドリアリボソームは大小サブユニットの両方がミトコンドリア内膜と相互作用する。リボソームタンパク質自身の内膜との相互作用に加えて、リボソームと内膜の相互作用を仲介する様々な因子が報告されている。このため、ミトコンドリアにおけるタンパク質合成は内膜上で起こり、新生ペプチドの合成と膜挿入過程が連動して起きていると考えられている (Liu and Spremulli, 2000; Ott and Herrman, 2010)。

また、ミトコンドリアリボソームタンパク質にはアポトーシスに関与するもの (DAP3, PDCD9) や転写の促進に関与するもの (MRPL12) など、リボソームタンパク質以外の機能

を持つものが多数報告されている (Koc et al., 2001; Surovtseva et al., 2011)。

(e) 翻訳因子

哺乳類ミトコンドリアにおいて、タンパク質合成の 4 つの過程 (開始、伸長、終結、リボソーム再生) に関与する翻訳因子は全て核ゲノムにコードされており、細胞質で合成された後、ミトコンドリアに輸送される。ミトコンドリア翻訳因子は原核生物のものとよく似ており、特に伸長過程についてはよく保存されている。しかし、原核生物とは異なる点もいくつか報告されている。開始過程においては、原核生物には 3 つの開始因子 IF1 (initiation factor 1)、IF2 (initiation factor 2)、IF3 (initiation factor 3) が存在するのに対して、哺乳類ミトコンドリアには IF2mt、IF3mt のみが存在し、IF2mt 特異的に存在する挿入領域が原核生物の IF1 の機能を担っている (Yassin et al., 2011)。また、原核生物において、伸長およびリボソーム再生の両方の過程に関与する EF-G (elongation factor G) に関しては、哺乳類ミトコンドリアでは 2 つの因子に機能が分担されており、EF-G1mt が伸長過程、EF-G2mt (RRF2mt) がリボソーム再生過程において機能する (Tsuboi et al., 2009)。

1.2 翻訳終結過程におけるペプチド解離

原核生物における翻訳の終結は mRNA の終止コドン (UAG、UGA、UAA) がリボソーム A-site に到達することで起こる。RF1 (release factor 1)、RF2 (release factor 2) がリボソーム A-site の終止コドン (UAG/UAA : RF1、UGA/UAA : RF2) を認識し、A-site に結合することで、P-site のペプチジル tRNA のペプチドの解離を引き起こす (図 3 (a))。

RF1、RF2 は同じドメイン構造を持ち、4 つのドメイン (ドメイン 1-4) から構成される (図 4)。ドメイン 3 には、ペプチジル tRNA の加水分解反応に関与する GGQ モチーフが存在する。ドメイン 2、4 は終止コドン認識に関与し、特に、ドメイン 2 に存在するトリペプチドアンチコドンモチーフ (RF1 : PxT、RF2 : SPF) は終止コドン認識において重要な役割を果たす。リボソームに結合した終結因子はリボソームの A-site を占有し、この時ドメイン 2、3、4 の配向は、通常の伸長過程におけるアミノアシル tRNA のものとよく一致する。以下に終結因子によるペプチド解離反応の概要を述べる (Korostelev et al., 2008; Lauberg et al., 2008)。

(a) 終止コドンの認識

RF1、RF2 において、トリペプチドアンチコドン (PxT : RF1、SPF : RF2) を含むドメイン 2、4 が、終止コドンと直接の相互作用をする (Ito et al., 2000)。終結因子によるコドン認識に伴い、リボソーム小サブユニットの 16S rRNA の decoding center (主に G530、A1492、A1493) では大きな再配列が起こる。再配列後の decoding center は、cognate tRNA のセン

スコドン認識の場合とは異なり、終結反応特異的な配向をとる。

(b) GGQ モチーフを介したペプチド解離反応

GGQ モチーフは全ての生物種の終結因子に保存されている。GGQ モチーフは、リボソーム大サブユニットのPTC(peptidyl transferase center)に配向し、PTCおよびP-site tRNA A76との相互作用を通して、求核攻撃を行う水分子を正しく配向する。これによって、P-siteのペプチジル tRNA から水分子へペプチドが転位され、ペプチドの解離が引き起こされる。

(c) 終止コドン認識と GGQ モチーフの配向の連動

終止コドン認識に伴うペプチド解離反応には、ドメイン3とドメイン4の間に存在するswitch loopが重要な役割を果たす。RF1、RF2においてswitch loopのアミノ酸配列の保存性は低い、両者において、この領域は、GGQ モチーフを含むドメイン3を正しく固定するのに重要な役割を果たす。リボソーム結合RF1/RF2の構造(closed conformation)は遊離RF1/RF2の構造(open conformation)とは大きく異なっている。終止コドン認識が引き金となり、リボソームとの相互作用とともにswitch loopの構造が変化し、ドメイン3がリボソーム大サブユニット上に固定される。これにより大サブユニットのPTCにおいてGGQモチーフが正しく配向され、ペプチドの解離につながる。

上記のように、終結因子によるペプチド解離反応は厳密に制御されており、非常に低いエラー頻度 ($10^{-3} \sim 10^{-6}$) の翻訳終結が成し遂げられている (Korostelev et.al., 2008; Laurberg et.al., 2008)。ペプチジル tRNA の加水分解の後、RF3 (release factor 3) の GTP 加水分解に依存した働きにより RF1/RF2 がリボソームから解離し (Gao et.al., 2007)、続いて EF-G と RRF によってリボソームが再生される (図3 (a))。

真核生物細胞質では eRF1/eRF3/GTP 複合体が A-site の終止コドン依存的にリボソームに結合することで翻訳の終結が引き起こされる (図3 (b))。原核生物と異なり、真核生物細胞質では、ペプチドの解離とリボソームサブユニットの解離が連動して起こり、eRF1、eRF3 および ABCE1 (Rli1 in yeast) が相互に関与する (Shoemaker and Green, 2011; Taylor et.al., 2012)。

哺乳類ミトコンドリアでは RF1Lmt/mtRF1a が翻訳の終結を担う (図3 (c))。RF1Lmt は UAA、UAG 両方の終止コドンを認識し、GGQ モチーフを介してペプチドの解離を引き起こす。ミトコンドリアには原核生物の RF3 に相当する因子は存在せず、RF1Lmt は単独でリボソームに結合しペプチジル tRNA の加水分解後、リボソームから解離する。その後、リボソーム再生反応は、ミトコンドリア特有のリボソーム再生因子 RRFmt および EF-G2mt によってリボソーム再生反応につながる (Soleimanpour-Lichaei et.al., 2007; Nozaki et.al., 2007; Tsuboi et.al., 2009)。

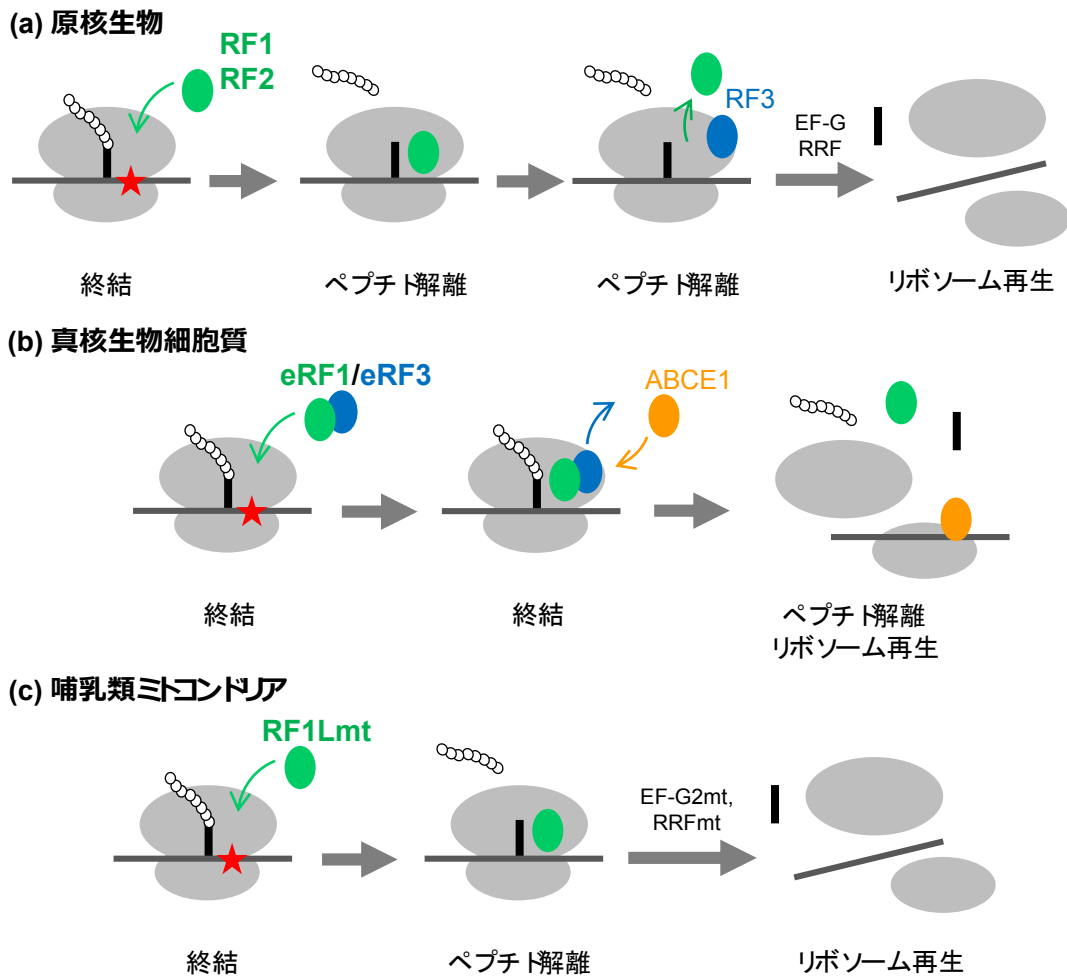


図3 原核生物、真核生物細胞質、哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳終結機構

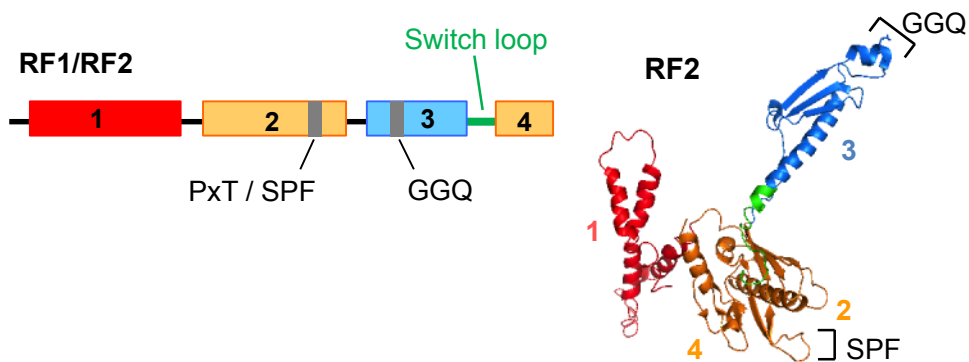


図4 RF1/RF2の構造

- (左) RF1/RF2のドメイン構造。
- (右) 70Sリボソーム結合*Thermus thermophilus* RF2 (完全長)の結晶構造 (Korosterev et al., 2008, PDB code 2WH1)。

1.3 大腸菌における異常停止したリボソーム複合体の解消機構

翻訳を開始した全てのリボソームが完全長のタンパク質を合成できるのではない。これは、大きなタンパク質の合成ほど著しく、例えば β -ガラクトシダーゼの合成の場合、25-31%のリボソームがタンパク質合成を完了できないことが *in vivo* および *in vitro* において報告されている (Jorgensen and Kurland, 1990; Manley, 1978)。終止コドンに欠失したような異常 mRNA などが翻訳されることで、翻訳伸長過程でペプチド合成が停止し、その後様々な機構によって合成されたタンパク質は分解に導かれている (Garza-Sanchez et al., 2011)。伸長過程でタンパク質合成が停止してしまった場合、翻訳伸長途中のリボソーム複合体はペプチジル tRNA をリボソーム P-site に含んだ状態で停止した異常停止複合体 (stalling complex) となる。細胞内にはこのような異常停止複合体に対する様々な解消機構が存在する。異常停止複合体が効率よく解消されることでリボソームや tRNA が再生され、細胞毒性につながらないようにしている。

異常停止複合体の解消機構として、原核生物には以下の3つの機構が存在する (図5)。

(a) tmRNA/SmpB による trans-translation

tmRNA/SmpB による trans-translation 機構は、異常停止リボソームの解消機構として最もよく研究が進んでおり、原核生物に広く保存されている。SmpB がリボソームのデコーディング領域に結合し、tmRNA のリボソームへの結合が媒介される。tmRNA は tRNA 様部分と mRNA 様部分を持つ約 350 ヌクレオチドの RNA である。tRNA 様部分はアンチコドンに欠いた構造を持ち、mRNA 用部分は 10 アミノ酸 (大腸菌の場合) と終止コドンをコードする ORF を含む。tmRNA/SmpB/EF-Tu 複合体はリボソーム A-site に結合し、P-site の peptidyl-tRNA からペプチドが転移される (図5 (a))。その後、異常停止していた truncated mRNA から、tmRNA の mRNA 様部分を鋳型とした翻訳に切り替わる。tmRNA の mRNA 様部分にコードされる 10 アミノ酸はタンパク質分解シグナルとなっており、trans-translation を終えた 10 アミノ酸が付加されたタンパク質は ClpXP などのプロテアーゼによって分解に導かれる (Pech and Nierhaus, 2012, Neubauer et al., 2012)。

SmpB の C 末端側 tail はリボソーム小サブユニットの mRNA channel に結合することで、truncated mRNA を含む異常停止リボソームを見分ける。これまでに、P-site 下流に 6 ヌクレオチド以上存在する場合には、tmRNA/SmpB による基質とならないことが報告されている。

また tmRNA は原核生物だけでなく葉緑体や原生生物のミトコンドリア (jakobid, oomycete のみ) にも存在する (Hafez et al., 2013; Gueneau et al., 2004)。一方で大腸菌を含む多くの原核生物において、ssrA (tmRNA コード遺伝子) は生育に必須ではなく、ssrA 欠損は生育速度の低下につながる (Moore and Sauer, 2007)。

(b) ArfA / RF2

近年、大腸菌において、ArfA (alternative ribosome rescue factor A, 別名 YhdL) を介した異常停止の解消機構が明らかになった (Schaub, et.al., 2012)。ArfA は β, γ -プロテオバクテリアにのみ保存されており (Garza-Sanchez et al., 2011)、truncated mRNA の末端で異常停止したリボソーム複合体の解消に関与することが報告された。また、tmRNA と ArfA の同時欠損は致死に至るが、どちらか一方の欠損は生育に影響が出ないことから、ArfA は tmRNA のバックアップシステムと考えられている。

tmRNA と ArfA の相互関係のメカニズムは次のように説明される。ArfA mRNA には終止コドンが存在せず、truncated mRNA として転写されている。そのため、trans-translation の基質となり通常はタンパク質合成後、分解に導かれる。しかし、細胞内の tmRNA の発現量が低下すると、tmRNA による翻訳終結と分解シグナルの付加は起こらず、ArfA 自身による ArfA truncated mRNA の翻訳終結 (異常停止の解消) が起こる。これによって ArfA の発現量が増加する。

ArfA は約 55 アミノ酸の小さなタンパク質であり、PTC (peptidyl transferase center) におけるペプチド解離反応に重要とされる GGQ モチーフを含まない。近年、ArfA は終結因子 RF2 と共同的に働くことで、RF2 の GGQ モチーフを介したペプチド解離反応を引き起こすことが明らかになった (Chadani et.al., 2012; Shimizu, 2012)。ArfA は tmRNA/SmpB と同様、P-site 下流に mRNA が存在しない異常停止複合体において機能することが示されており、A-site およびその下流に mRNA が存在する場合にはほとんどペプチド解離を引き起こさない (Shimizu, 2012)。ArfA は終止コドンが存在しないリボソームへの RF2 の結合を可能にしていると考えられるが、ArfA と RF2 の直接の相互作用は見られておらず、むしろ ArfA とデアシル tRNA との相互作用が報告されている。ArfA の作業仮説としては、次の 2 つの機構が提唱されている (図 5 (b))。①ArfA/tRNA 複合体がリボソーム A-site に結合した後、リボソーム上で tRNA と RF2 が入れ替わる (Chadani et al., 2012)。②ArfA/tRNA 複合体がリボソーム E-site に結合することでリボソームの構造変化につながり、リボソーム A-site に RF2 が結合する (Pech and Nierhaus, 2012, Chadani et al., 2012)。ArfA/RF2 の作用機序の解明のために、ArfA と RF2 の相互作用や ArfA のリボソーム結合部位などに関するさらなる研究が期待されている。

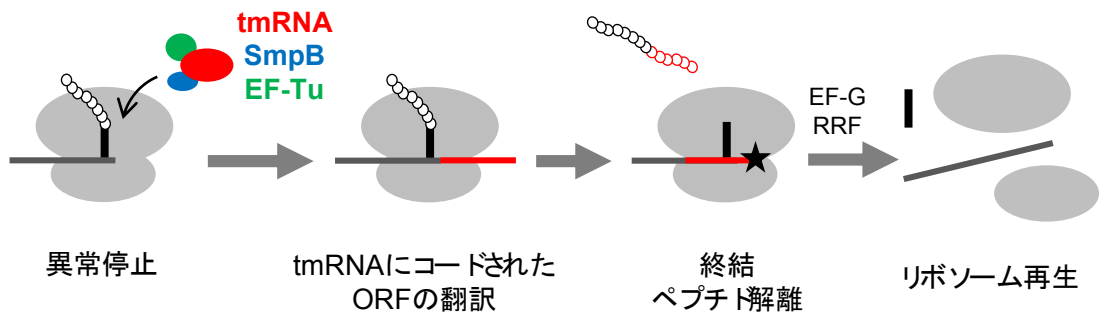
(c) ArfB

原核生物には、異常停止の解消因子として、tmRNA や ArfA とは全く異なる機構をもつ ArfB (alternative ribosome rescue factor B, 別名 YaeJ) が存在する (図 5 (c)) (Handa et.al., 2010)。ArfB は大腸菌などグラム陰性細菌の多くに存在し、また真核生物にもそのオーソログ ICT1 が保存されている。大腸菌における tmRNA/ArfA 同時欠損は生育阻害につながり、ArfB の通常の発現量では補うことができないが、ArfB の過剰発現により、tmRNA/ArfA 同時欠損による生育阻害が回復できる (Chadani et.al., 2011)。従って ArfB は tmRNA や ArfA に次ぐ異常停止解消のための第三の機構と考えられている。大腸菌のプロテオーム解析に

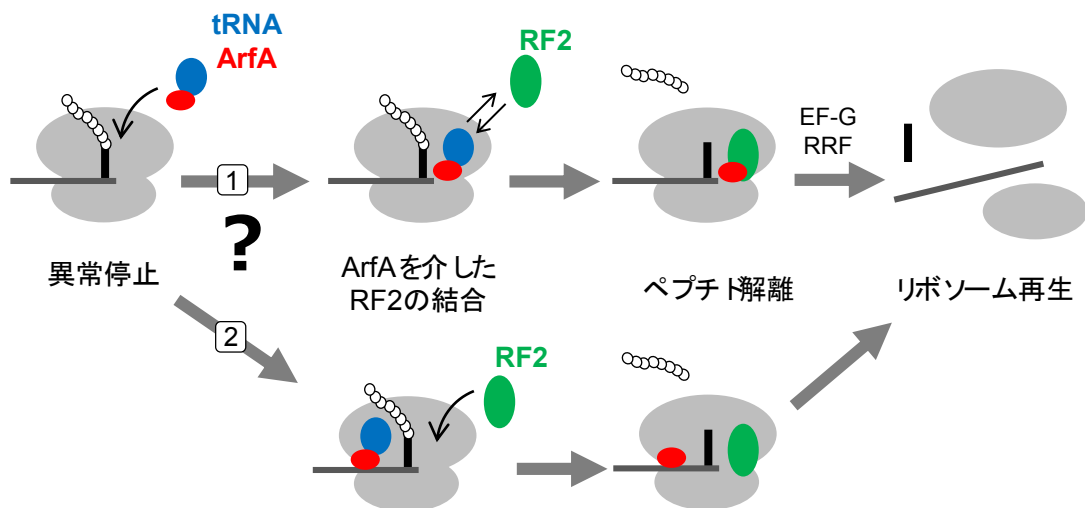
よると、ArfB のタンパク質発現量は 0.526 (molecules/cell) となっており、SmpB の 14.608 と比較すると非常に低く、大腸菌における異常停止の解消機構においては、tmRNA/SmpB が主に機能すると考えられている (Shimizu, 2012)。

ArfB の作用機構に関しては 1-5 項で詳しく述べる。

(a) tmRNA/SmpB



(b) ArfA/RF2



(c) ArfB (YaeJ)

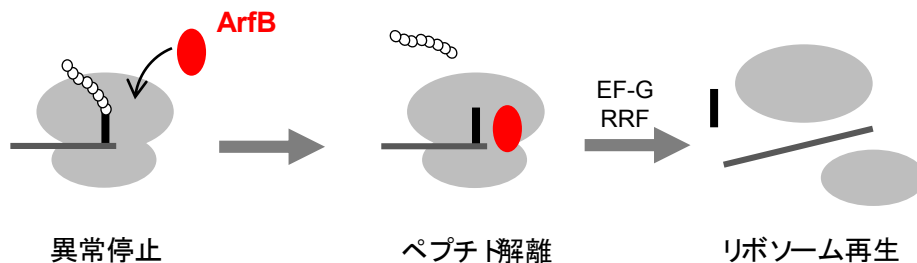


図5 大腸菌における異常停止したリボソーム複合体の解消機構

1.4 哺乳類ミトコンドリアにおけるペプチド解離因子

哺乳類ミトコンドリアには GGQ モチーフを持つペプチド解離因子として、4つの因子、RF1Lmt、RF1mt、ICT1、C12orf65 が存在する (図 6; Duarte et al., 2012)。

RF1Lmt と RF1mt は原核生物における終結因子 RF1 のオーソログであり、RF1Lmt、RF1mt と *T. thermophilus* RF1 のアミノ酸配列同一性 (sequence identity) はそれぞれ 45%、38% と非常に高い (Huynen et al., 2012)。RF1Lmt および RF1mt は原核生物の終結因子と同様 4 つのドメインから成り、GGQ モチーフとコドン認識領域を持つ。このうち RF1Lmt のみが、A-site の終止コドン (UAA、UAG) 依存的にペプチド解離を行う終結因子として報告されている。長い間、RF1mt についても翻訳終結因子ではないかと考えられてきており (Young et al., 2010)、RF1Lmt が認識しない AGG、AGA コドン依存的なペプチド解離活性が推測されてきた。さらに、その配列やモデル構造から、A-site コドン非存在下におけるペプチド解離活性など、異常停止解消に関与する機能なども推測されている (Huynen, et al., 2012)。しかし、RF1mt のペプチド解離活性は未だに検出されておらず、その機能は明らかになっていない (Nozaki et al., 2008; Soleimanpour-Lichaei et al., 2007)。

一方で、ICT1 と C12orf65 は終結因子のドメイン 3 だけを持つ。このため、GGQ モチーフは存在するが、コドン認識領域を欠いており、RF1Lmt や RF1mt の半分ほどの大きさとなっている (Kogure et al., 2012)。ICT1 に関してはリボソームの A-site のコドン非依存的なペプチド解離活性が報告されており、その機能について次項で詳しく述べる。C12orf65 は、ミトコンドリア翻訳機能低下につながる病原変異が報告されている (Antonicka et al., 2010)。C12orf65 の変異によるミトコンドリア翻訳機能の低下は ICT1 の過剰発現によって部分的に回復するため、ICT1 と C12orf65 は部分的に重複した機能を持つと推測されている。ICT1 と C12orf65 はどちらも生育に必須のミトコンドリアタンパク質であるが、ICT1 と C12orf65 の欠損による細胞に及ぼす影響は異なり、両者はペプチド解離因子としての異なる役割を担うことが示唆されている (Kogure et al., 2012)。C12orf65 のペプチド解離能については未だに検出されておらず、その機能については不明である。

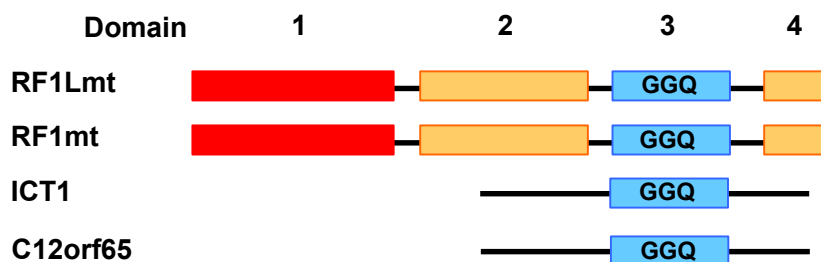


図6 哺乳類ミトコンドリアのペプチド解離因子

1.5 ICT1

1.5.1 哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳の異常停止

tmRNA は原核生物に広く保存されており、原核生物における異常停止の主要な解消機構となっている (Moore and Sauer, 2007)。一方で、哺乳類ミトコンドリアやその他多くの生物種のミトコンドリアには tmRNA に相当する因子は存在しない。mtDNA にコードされる遺伝子数が多く、バクテリア様遺伝子を持つとされる一部の原生生物のミトコンドリア (jakobid, oomycete) にのみ、tmRNA の存在が確認されている (Hafez et al., 2013; Burger et al., 2013)。

ミトコンドリアにおけるタンパク質合成は膜挿入過程と連動して起こると考えられており、膜挿入の異常に伴う翻訳の異常停止が生じやすいと推測される。また、mtDNA は核 DNA と比較して約 10 倍も高い変異率を有していると言われている (設楽ら, 2010)。さらに、ヒトミトコンドリアの DNA ポリメラーゼが mtDNA の中に塩基を取り込む時にミスする確率は、44 万塩基対当たり 1 個の割合であるという報告もある (米川ら, 2008)。この値から mtDNA 上のいずれかの塩基の 1 つに突然変異を持った mtDNA が、30 個に 1 個の割合で存在すると推測されている。

終止コドンの欠失など突然変異による mRNA の異常が生じやすいと考えられる。さらに、哺乳類ミトコンドリアでは AGA と AGG に対応する tRNA や終結因子は存在しないため、mRNA の ORF にこれらのコドンが出現した場合は翻訳反応が停止する。このように、ミトコンドリア内のタンパク質合成系には、原核生物と同様に、翻訳の異常停止につながる様々な要因が存在する。しかし長い間、ミトコンドリアにおける翻訳異常停止の解消機構は知られてこなかった。近年、ICT1 がリボソーム依存的コドン非依存的なペプチド解離活性を持つことが報告され、ICT1 はミトコンドリアにおける翻訳の異常停止解消因子であると考えられた。

1.5.2 ICT1 の同定

ICT1 はもともと、ヒト大腸癌細胞 HT29-D4 において、分化の際にその mRNA 量が減少する遺伝子として同定され (Belzen et al., 1995; Belzen et al., 1998)、immature colon carcinoma cell transcript (ICT1) と名付けられた。ICT1 は真核生物に広く存在し (Duarte et al., 2012)、また、原核生物にもそのオーソログとして ArfB (YaeJ) が存在する。ArfB は大腸菌などグラム陰性細菌の多くに存在するが、*Thermus thermophilus* には存在しないなど、真核生物と比較すると、原核生物における ArfB の保存性は低い。真核生物 ICT1 と原核生物 ArfB は 29%

の配列同一性、55%の配列相同性を持ち、同様の構造を有している。

真核生物において ICT1 は核ゲノムにコードされており、細胞質でタンパク質に合成された後、N 末ミトコンドリア移行シグナルに従ってミトコンドリアに輸送される。細胞における ICT1 の欠損は、mtDNA コードタンパク質の合成量低下を引き起こし、ミトコンドリアの形態変化や膜電位低下など様々なミトコンドリア機能異常につながり、細胞増殖速度の低下が見られる (Handa et al., 2010; Richter et al., 2010)。

1.5.3 ICT1/ArfB の構造と生化学的解析

これまで報告されている ICT1 や ArfB の構造解析によりその詳細な構造モチーフが明らかにされている (Gagnon et al., 2012; Handa et al., 2011; Handa et al., 2010)。ICT1 および ArfB は、N-globular 領域と C-tail 領域、N 末と C 末をつなぐ flexible-linker から構成される (図 7)。N-globular 領域は終結因子 RF1、RF2 のドメイン 3 と同様の配列および構造となっており、3 つの β シート構造とペプチド解離反応に重要とされる GGQ モチーフが存在する (β 1-GGQ- β 2- β 3)。また、終結因子のドメイン 3 と異なる点として、 β 2- β 3 間に α -helix 構造 (α 2) を含む 25 残基の挿入領域が存在し、ICT1/ArfB に特異的に存在する。C-tail 領域は、ICT1/ArfB に特有の配列であり、 α -helix 構造を含み塩基性アミノ酸に富んでいる。

近年、ICT1 および ArfB に関して大腸菌 70S リボソームを用いた *in vitro* タンパク質合成系における生化学的解析が行われ、ICT1/ArfB の構造上の特徴と一致して、リボソーム依存的、コドン非依存的なペプチド解離活性が示された (Handa et al., 2011; Richter et al., 2010; Shimizu, 2012)。

1.5.4 ICT1/ArfB の C-tail 領域

Thermus thermophilus 70S リボソームを用いたリボソーム結合 ArfB の結晶構造解析により、ArfB のリボソーム結合部位および C-tail 領域の役割が明らかになった (Gagnon et al., 2012)。ArfB のリボソームへの結合は、リボソームサブユニット間の大きな構造変化は引き起こさない。ArfB の N-globular 領域は 50S 大サブユニットの A-site に結合し、C-tail 領域は 30S サブユニットに伸びている (図 7B)。C-tail 領域は溶液中の遊離 ArfB では構造を取らず、リボソームに結合することで構造を取り、塩基性表面を持つ α -helix 構造を形成する。さらに ArfB の C-tail 領域は、30S サブユニットにおいて mRNA entry channel を占有し、A-site mRNA と競合する。従って、ArfB の C-tail 領域は、mRNA 非存在下の A-site に結合することで、異常停止状態のリボソームを認識する役割を持つと考えられている。これと一致して、近年の ArfB の生化学的解析では、A-site 下流の mRNA の長さの増加に伴いペプチド解離活性

が低下することが示されている (Shimizu, 2012)。また、C末側 10 アミノ酸の欠失はリボソームへの結合能を失うことが報告されている (Handa et al., 2011)。

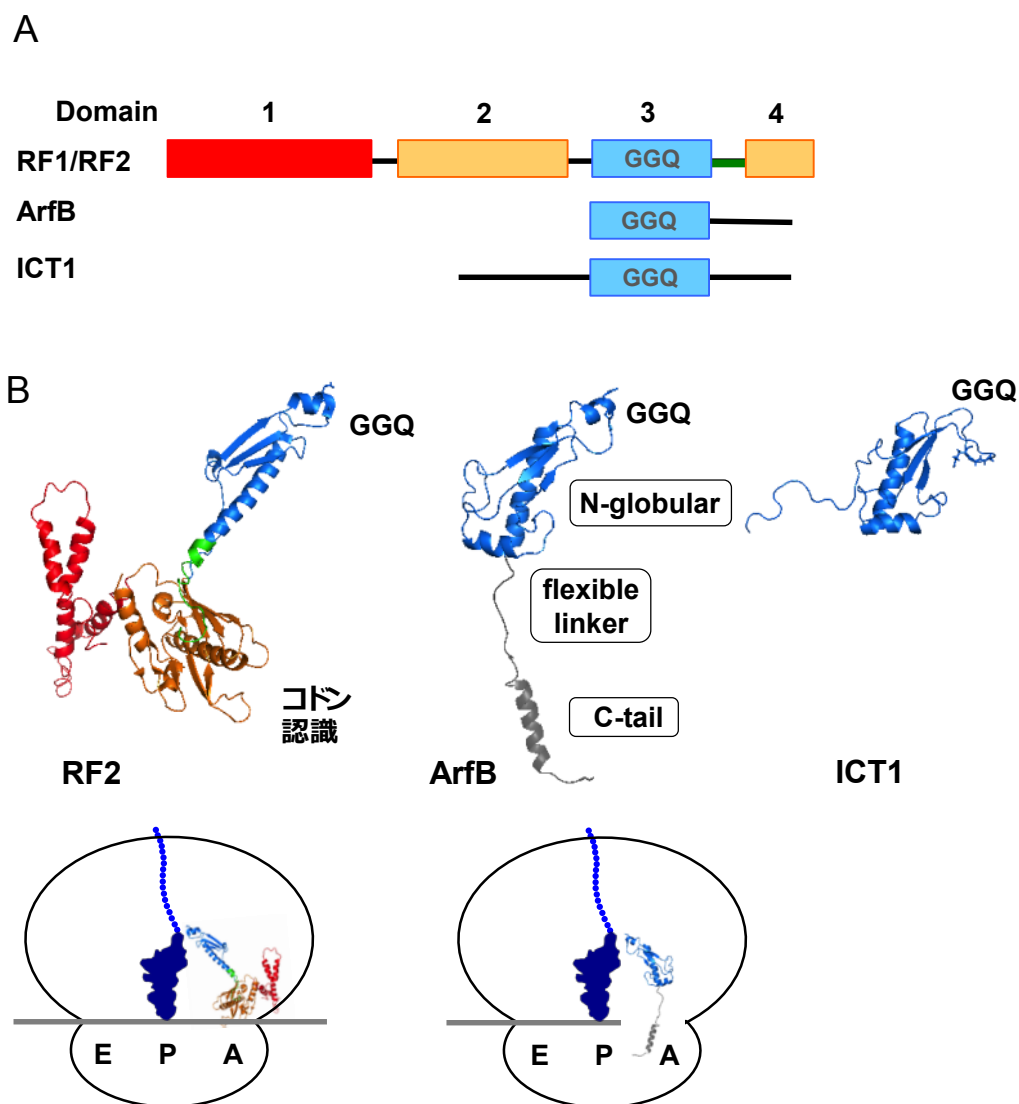


図7 ICT1/ArfBとRF2の構造比較

- A: 終結因子RF1/RF2とArfB、ICT1のドメイン構造比較。
 B: (左) 70Sリボソーム結合*Thermus thermophilus* RF2 (完全長) 結晶構造 (図4と同様)。
 (中央) 70Sリボソーム結合ArfB (完全長) 結晶構造 (Gagnon et al., 2012, PDB code 4DH9)。
 (右) 溶液中遊離ICT1 (Glu63-Ser162) のNMR構造 (Handa et al., 2010, PDB code 1J26)。
 リボソームスケッチ (下図) は、リボソームの左側にmRNAの5'側、右側に3'側が位置するように描かれ、RF2およびICT1は鏡像となっている。

1.5.5 リボソームタンパク質としての ICT1

ICT1 は様々なミトコンドリアリボソームタンパク質 (mitochondrial ribosome protein, MRP) と相互作用することが見られている。免疫共沈降法によって ICT1 との相互作用タンパク質を解析すると、MRPL3、MRPL12、MRPS6、DAP3 (MRPS29) を始めとした多くのミトコンドリアタンパク質が検出される。また、ミトコンドリア抽出液をショ糖密度勾配遠心法によって分画すると、ICT1 と 39S 大サブユニットタンパク質は同じ挙動を示し、さらに、細胞における ICT1 のノックダウンは、39S 大サブユニットタンパク質の安定性低下につながる。これらの結果から、ICT1 はリボソームに構成的に結合する大サブユニットタンパク質であると推測された (Richter et al., 2010)。

上記の報告によって初めて、ICT1 がミトコンドリアリボソームタンパク質であると推測されたが、一方で、過去に行われてきたミトコンドリアリボソームタンパク質の解析では、ICT1 は同定されてこなかった (Goldschmidt-Reisin et al., 1998; Koc et al., 2001; Suzuki et al., 2001)。このため、ICT1 がリボソームタンパク質であるかどうかは不明であった。これに対し、近年になって、ミトコンドリアリボソームタンパク質についての質量分析法を用いた再解析が行われた。この解析によって、5つの新たな因子がミトコンドリアリボソームタンパク質として同定され、そのうちのひとつとして、ICT1 が MRPL58 として同定された (Koc et al., 2013)。

一方で ArfB はリボソームタンパク質ではない。ICT1 と ArfB はペプチド解離因子として同様の機能を持つと考えられているものの、ICT1 はリボソームタンパク質としての機能も担っている。リボソームタンパク質の ICT1 がペプチドの解離を行うのか、リボソームとは別の ICT1 が機能するのかが不明である。このため、ICT1 と ArfB が同様の作用機序でペプチド解離を行うのかが明らかではなく、これらの細胞内における生理的役割は異なっていると考えられる。

1.5.6 ICT1/ArfB の作用機序に関する疑問

ICT1 はミトコンドリアにおいてリボソームに構成的に結合するリボソームタンパク質である。一方で、GGQ モチーフを持ち、ペプチド解離因子として機能する。

先行研究において、ICT1 の作用機序が推測されている (Richter et al., 2010)。この推測によると、ICT1 はリボソーム大サブユニットの PAS (polypeptide accessible site ; exit tunnel 近傍に存在する空洞であり、ミトコンドリア 55S リボソーム特有の構造) と呼ばれる部位に結合する。異常停止において、P-site のペプチジル tRNA が配向を変えることで、リボソーム中の ICT1 がペプチジル tRNA にアクセスできるようになり、これによってペプチドの解離が引き起こされる。

しかし、GGQ モチーフを介したペプチジル tRNA の加水分解は厳密に制御されており、リボソーム大サブユニットにおいて、A-site 側から GGQ モチーフを PTC (peptidyl transferase center) に配向させることで初めて、水分子による求核反応が可能となる。従って、先行研究において推測されているような、リボソームタンパク質の ICT1 が exit tunnel 側からペプチドの解離に関与するとは考えにくい。

これまで、リボソームタンパク質がペプチド解離因子として機能する例は知られていない。リボソーム内の ICT1 がペプチド解離を行うのか、リボソームタンパク質とは別の ICT1 がペプチド解離を行うのかは明らかではない。したがって、現在のところ ICT1 の生理的役割やその作用機序は不明である。ミトコンドリアリボソームはその調製が難しいことから、これまで ICT1 の生化学的解析は全て大腸菌 70S リボソームを用いたヘテロな系で行われてきた。しかし ICT1 の特徴を考慮した解析のために、今後、ミトコンドリア 55S リボソームを用いた解析が必須であると考えられる。

さらに ICT1 と ArfB の共通する疑問点として、終結因子のような終止コドン認識による構造変化を伴わない ICT1/ArfB においては、GGQ モチーフの配向がどのように制御されているのか、その詳細な機構は不明である。

1.6 本研究の目的

本研究は、哺乳類ミトコンドリア内のタンパク質合成系において、異常停止したリボソーム複合体の解消機構を明らかにすることを目的とした。ミトコンドリアペプチド解離因子の1つである ICT1 が、異常停止に対する主要な解消因子であると考えられているが、その詳細な作用機序は明らかではない。従って本研究では ICT1 の機能解析を行うことで、ミトコンドリアにおける異常停止したリボソーム複合体の解消機構の解明を目指した。

始めに、ミトコンドリアの ICT1 に特有な機能の解析として、リボソームタンパク質としての役割を考慮して、ミトコンドリア 55S リボソームにおける ICT1 のペプチド解離活性の解析を行った。次に、ICT1/ArfB family に共通する機能の解析として、ICT1 の基質特異性について調べ、また、ペプチド解離活性に重要となる機能領域を同定した。

2 実験手法

2.1 ミトコンドリア 55S リボソームの調製

ミトコンドリア 55S リボソームは先行研究に従って、豚肝臓ミトコンドリアから調製した (Spremulli, 2007)。4 kg 豚肝臓から約 120 g のミトプラストを回収した。ミトプラストを Extraction buffer (0.26 M Sucrose, 40 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 15 mM Tris-HCl [pH7.5], 0.8 mM EDTA [pH 8.0], 1.6% Triton X-100, 6 mM 2-mercaptoethanol, 0.05 mM Spermine, 0.05 mM Spermidine, 0.1 mM PMSF) で懸濁し、二度の遠心 (Beckman 45Ti, 21000 rpm, 30 min, 4 °C) によりデブリを除去した。上清 (= S30) は最終濃度 300 mM KCl に調製し、sucrose cushion (1 M Sucrose, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1.0 % Triton X-100, 6 mM 2-mercaptoethanol) の下で遠心 (Beckman 45Ti, 35000rpm, 22 – 30 hr, 4 °C) し、沈殿させた。ペレットは re-association buffer (15 mM Tris-HCl [pH 7.5], 20 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 6 mM 2-mercaptoethanol) で最懸濁し、最終濃度 200 mM KCl に調整した。Triton X-100 を含まない sucrose cushion の下で、遠心 (Beckman 45Ti, 35000rpm, 20 hr 以上, 4 °C) によって沈殿させた。ペレットは re-association buffer で懸濁し、定量した (mt crude ribosome)。

mt crude ribosome はピューロマイシン反応 (最終濃度 0.5 mM puromycin, 27 °C, 15 分) の後、6 – 38 % sucrose gradient/re-association buffer を用いた遠心 (Beckman SW28, 20000 rpm, 16 hr, 4 °C) によって 55S リボソームを分画した。サンプルは re-association buffer で 2 倍以上に希釈し、遠心 (Beckman 45Ti, 23000 rpm, 27 hr, 4 °C) によって沈殿化させた。re-association buffer で懸濁した。サンプルの定量後、5 μM に調整し、精製ミトコンドリア 55S リボソームとした。55S リボソームの濃度は 32 pmol/A₂₆₀ として計算した。4kg 豚肝臓から約 2000 - 3000 pmol の 55S リボソームが回収された。

2.2 55S リボソームのショ糖密度勾配による分画

55S リボソーム (75 pmol) を 15 - 30%ショ糖密度勾配 (55S の分画:10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 80 mM NH₄Cl, 8.2 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 28S, 39S の分画:10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 200 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM GDP, 1 mM DTT) に重層し、遠心 (Beckman SW41Ti, 39000 rpm, 5.5 時間) によって分画した。サンプルは、density gradient fractionator (Towa Labo, Model 152-001) を用いて、260 nm の吸光度測定とともに回収した。回収したサンプルについて、ICT1 抗体を用いた Western blotting によって解析した。

2.3 ヒト由来 ICT1 の発現・精製

N 末 His タグ付き ICT1 の大腸菌発現用ベクターとして、HMICT1/pET15b を用いた。ヒト ICT1 の配列をコードする EST clone (IOH11951) を invitrogen から購入し、目的配列をプライマー、5'-CGGTGCCCCACGCCATATGCTGCACAAGCAGAAAGACGGCACTG-3', 5'-GAG GCTCGAGTCAGTCCATGTCGACCCTCCTGCTT-3'を用いて PCR で増幅した。当研究室で構築された制限酵素部位が増加された pET15b (pET15b-linker) を用いて、制限酵素部位 NdeI/XhoI にインサート配列をクローニングした。

HMICT1/pET15b は *E.coli* Rosetta (DE3)/pLysS に形質転換した。菌体は LB 培地で 37 °C 一晩培養し、full growth の菌体を 1/100 希釈で本培養に植継いだ。2×YT 培地、37 °C で培養し、OD₆₀₀ = 0.4~0.6 で、100 μM isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside (IPTG) によって発現誘導を行った。その後 18 °C で一晩培養し、菌体を回収した。

タンパク質は Ni-NTA (QIAGEN) カラムクロマトグラフィーで精製し、スロンビンプロテアーゼ (GE healthcare) で His タグを切除した。続いて、Q-sepharose カラムクロマトグラフィーによる精製を行い、flow through 画分を回収した。回収サンプルは 5mg/ml まで濃縮し、-80°C で保存した。

ICT1 の変異体の大腸菌発現ベクターは HMICT1/pET15b を鋳型として以下のプライマーを用いて PCR によって増幅した。GSQ : 5'-GTGGTCCTGGGTCGCAGAATGTGAAC-3', 5'-GTTACATTCTGCGACCCAGGACCAC-3', ΔC : 5'-TGACTCGAGGGTACCCCGCGGGCGG-3' and 5'-TCTCTTTTGTCTCAGCCTTTCCCGATTC-3', R116A : 5'-ATCGCGGAGCCCGTGGCGCAGAAGATAGCCAT-3', 5'-ATGGCTATCTTCTGCGCCACGGGCTCCGCGAT-3', K118A : 5'-GAGCCCGTGCAGGCGATAGCCATCACGCA-3', 5'-TGCGTGATGGCTATCGCCTGCCGCACGGGCTC-3', K124A : 5'-ATAGCCATCACGCATGCAAACAAGATCAACAG-3', 5'-CTGTTGATCTTGTGGCATGCGTGATGGCTAT-3', K126A : 5'-ATCACGCATAAAAACGCGATCAACAGGTTAGG-3', 5'-CCTAACCTGTTGATCGGTTTTTATGCGTGAT-3', R129A : 5'-AAAAACAAGATCAACGCGTTAGGAGAGTTGAT-3', 5'-ATCAACTCTCCTAACGCGTTGATCTTGT-3', 124-126-129A : 5'-ATAGCCATCACGCATGCAAACGCGATCAACGCGTTAGGAGAGTTGATCC-3', 5'-GGATCAACTCTCCTAACGCGTTGATCGGTTGATGCGTGATGGCTAT-3'

これらの変異体は野生型と同様に発現、精製を行った。

His タグ付き ICT1 の発現・精製は、スロンビンプロテアーゼを添加しないことを除き、上記と同様にして行った。

2.4 RF2-ICT1α2 変異体の発現・精製

E. coli RF2/pET15b (NdeI/BamHI) に対して HMICT1/pET15b の $\alpha 2$ 領域を In-Fusion 反応 (takara) によって付加した。*E. coli* RF2/pET15b は当研究室で調製されたものを用いた。鋳型 *E. coli* RF2/pET15b に対しては、プライマー、5'-GGTACGGTTAACGTGCTGACCGCCC-3'、5'-CGTCCCCAGCACAAAGAACAAGATC-3'によって、鋳型 HMICT1/pET15b に対しては、プライマー、5'-CACGTTAACCGTACCAATTCCAAGGCAGAAGTCAGGTTCC-3'、5'-CTTGTGCTGGGAACGGCTGCTCTCAGAGGTGAGGATCAAC-3'を用いて PCR によって目的の配列を増幅し、In-Fusion 反応 (takara) によってクローニングを行った。

RF2-ICT1 $\alpha 2$ /pET15b は *E. coli* Rosetta (DE3)/pLysS に形質転換した。菌体は LB 培地で 37 °C 一晚培養し、full growth の菌体を 1/100 希釈で本培養に上継いだ。2×YT 培地、37 °C で培養し、OD₆₀₀ = 0.4~0.6 で、100 μ M isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside (IPTG) によって発現誘導を行った。その後 18 °C で一晚培養し、菌体を回収した。

タンパク質は Ni-NTA (QIAGEN) カラムクロマトグラフィーで精製し、スロンビンプロテアーゼ (GE healthcare) で His タグを切除した。続いて、Hi-TrapQ カラムを用いた HPLC による精製を行った。回収サンプルは濃縮し、-80°C で保存した。

2.5 *in vitro* 55S peptide release assay

Heteropolymeric MFV mRNA および MF-stop mRNA は run-off transcription によって転写した (Triana-Alonso et al., 1995)。MFV mRNA/MF-stop mRNA の配列は以下の通りである。5'-GGGAAAAGAAAAGAAAAGAAA-AUG-UUC-GUU/UAA-AAAAGAAAAGAAAAGAAAUAUUGAAUU-3'。中心部に 3 つのコドン (Met-Phe-Val) または 2 つのコドンと終止コドン (Met-Phe-UAA) を含む。

tRNA^{Phe} は Sigma-Aldrich から購入し、ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} (N-acetyl-[³H]Phe-tRNA^{Phe}) は逆相 HPLC (Nucleosil 300-5 C4) を用いてメタノール勾配によって精製した (Triana et al., 1994)。

反応は全て binding buffer (20 mM Hepes-KOH (pH7.6)、4.5 mM Mg(OAc)₂、150 mM KOAc、0.05 mM spermine、4 mM 2-mercaptoethanol) の下で行った。20 pmol 55S リボソーム、200 pmol MFV/MFstop mRNA、20 pmol ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} を含む 50 μ l の反応液において、37 °C、15 分でプレインキュベーションを行うことで、3 者複合体を形成させた。80 pmol ICT1/RF1Lmt/RF1mt を添加の後、さらに 25°C、45 分インキュベートした。

等量の 1N HCl の添加によって反応を止めた。解離された ac[³H]Phe を酢酸エチルによって抽出し、5 ml Ultima gold に加え、[³H] Phe の量をシンチレーションカウンターによって解析した。

mRNA 非存在下における反応は、20 pmol 55S リボソーム、20 pmol ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} を

含む pre-incubation の後、上記と同様に行った。

55S リボソームの ac³H]Phe-tRNA^{Phe} 結合能解析では、上記と同様にして、20 pmol 55S リボソーム、200 pmol MFV/MFstop mRNA、指定量の ac³H]Phe-tRNA^{Phe} を 50 µl の反応液で混合させ、37 °C、15 分のインキュベーションによって 3 者複合体を形成させた。その後、サンプルをニトロセルロースフィルターにロードし、binding buffer で洗浄することでリボソームに結合していない ac³H]Phe-tRNA^{Phe} をフィルターから除去した。フィルターを 5 ml Ultima gold に入れ、フィルター上のリボソーム/mRNA/ac³H]Phe-tRNA^{Phe} の量をシンチレーションカウンターによって解析した。

2.6 *in vitro* multi-round translation assay

鋳型 DNA は、pURE1 (Post Genome Institute Co., Ltd) を用いて、PCR によって調製した。プライマーは、T7 promoter primer 5'-GCGCGTAATACGACTCACTATAG-3', 3' primer 5'-GATCCCTAGAACAGTTAGAACAGGAAGAACATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT-3' (stop) ; 5'-GATCCCTAGAACAGTCTGAACAGGAAGAACATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT-3' (stall) ; 5'-GAACAGGAAGAACATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT-3' (nonstop) (下線は MFFLF ペプチドをコード) を用いた。従って mRNA の配列は、以下の通りである。Nonstop mRNA: 5'-GGGAGACCACAACGGUUUCCCUCUAGAAAUAUUUUUGUUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUCAUUGUUCUUCCUGUUC-3', stop (UAA) mRNA: 5'-GGGAGACCACAACGGUUUCCCUCUAGAAAUAUUUUUGUUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUCAUUGUUCUUCCUGUUCUAACUGUUCUAGGGAUC-3' ; and stall (AGA) mRNA: 5'-GGGAGACCACAACGGUUUCCCUCUAGAAAUAUUUUUGUUUAACUUUAAGAAGGAGAUAUCAUUGUUCUUCCUGUUCAGACUGUUCUAGGGAUC-3' (下線は MFFLF ペプチドをコード)。また、Pro 挿入鋳型 DNA の作成には、プライマーは、3' primer 5'-GATCCCTAGAACAGTTAAGGAGGAGGGAACATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT-3' (3P) ; 5'-GATCCCTAGAACAGTTAAGGAGGGAAGAACATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT-3' (2P) ; 5'-GATCCCTAGAACAGTTAAGGCAGGAAGAACATATGATATCTCCTTCTTAAAGTT-3' (1P) (下線は MFFLF ペプチドをコードし、二重線は Pro を示す) を用いた。 [¹⁴C]メチオニンラベル fMet-tRNA は先行研究と同様にして調製した (Tsuboi et al., 2009)。

In vitro タンパク質合成系は、先行研究 (Tsuboi et al., 2009, Shimizu et al., 2001) と同様にして再構成したが、以下に述べる変更を加えた。RRF を反応系から除き、リボソーム再生因子として EF-G2mt (0.8 µg)、RRFmt (0.2 µg) を加えた。またペプチド解離因子として、大腸菌 RFs を反応系から除き、RF1Lmt (0.5 µg), RF1mt (2 µg), ICT1 (1.1 µg) をそれぞれ添加した。アミノアシル tRNA 合成酵素として、フェニルアラニル tRNA 合成酵素とロイシル tRNA 合成酵素のみを加え、またアミノ酸はフェニルアラニンとロイシンのみを用いた。

反応 (50 μ l) は鋳型 DNA (0.2 pmol) と f[¹⁴C]Met-tRNA (100 pmol) の添加により開始し、37 °C、指定時間で行った。等量の 1 N HCl の添加により反応を終了させ、酢酸エチルによって合成されたペプチドを抽出した。ポリペプチドに挿入された[¹⁴C]メチオニンの量をシンチレーションカウンターによって解析した。

2.7 Polysome Breakdown Assay

ポリソームは先行研究 (Tsuboi et al., 2009) と同様にして、大腸菌 A19 株から調製した。反応 (250 μ l) は、大腸菌ポリソーム (2.0 A₂₆₀)、RRFmt (15 μ g)、EF-G2mt (30 μ g)、ペプチド解離因子 (RF1Lmt, RF1mt 60 μ g; ICT1, 50 μ g; 10 μ M ピューロマイシン) がバッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 80 mM NH₄Cl, 8.2 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 0.5 mM GTP) の下で混合された。30 °C、20 分のインキュベーションの後、サンプルは 15% - 30% (w/v) ショ糖密度勾配 (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 80 mM NH₄Cl, 8.2 mM MgSO₄, 1 mM DTT) において超遠心 (Beckman SW41Ti, 39000 rpm、2 時間) によって分画された。サンプルは、density gradient fractionator (Towa Labo, Model 152-001) を用いて、260 nm の吸光度測定とともに回収された。

2.8 膜挿入と共役した *in vitro* translation assay

In vitro タンパク質合成系は、先行研究 (Tsuboi et al., 2009, Shimizu et al., 2001) と同様にして再構成した。SecYEG プロテオリソームおよび SecA は当研究室で調製されたものを使用した。鋳型 DNA は、当研究室で調製された T7 プロモーターおよび *ompA* 全長を含むプラスミドを鋳型として、PCR によって調製した。プライマーは、T7 promoter primer 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGG-3', 3' primer 5'-AGCCTGCGGCTGAGTTACAACGTCT-3' (nonstop) ; 5'- TTAAGCCTGCGGCTGAGTTACAACGTCT-3' (stop) を用いた。[³⁵S]Met 存在下の *in vitro* タンパク質合成系において、SecYEG プロテオリソーム、SecA を添加し、タンパク質合成を行った (10 μ l 反応系、30°C、1 時間)。その後、クロラムフェニコール (終濃度 33 ng/ μ l) の添加によって反応を止めた。Proteinase K (終濃度 0.5 mg/ml) を添加し 25°C、20 分反応させることで、プロテオリソーム外の pOmpA (proOmpA, outer membrane protein A precursor) を分解した。TCA 沈殿、アセトン沈殿により余分な脂質成分を除去した後、SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE のバンドは[³⁵S]Met の挿入によって検出し、BAS5000 を用いて解析した。

2.9 ribosome/ICT1 binding assay

大腸菌 70S リボソームは *in vitro* multi-round translation assay と同様にして調製した。ドットブロット解析は反応 (50 μ l) で行い 12.5 pmol 大腸菌リボソームおよび指定量の ICT1 を buffer A (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 80 mM NH_4Cl , 8.2 mM MgSO_4 , 1 mM DTT) 中で混合した。30 $^\circ\text{C}$ 、20 分のインキュベーションの後、Microcon-YM100 column (Millipore) にロードし、3000 \times g、4 $^\circ\text{C}$ 、5 分で遠心した。100 μ l buffer A でカラムを 2 度洗浄した後、50 μ l buffer A を加え、室温、1 分のインキュベーションによって、サンプルを回収した。サンプルの回収は、新しいチューブにおいてカラムを反転させ 10000 \times g、4 $^\circ\text{C}$ 、5 分の遠心により回収した。さらに、100 μ l buffer A でリンスした。回収したサンプルは buffer A を用いて 500 μ l までボリュームアップし、そのうち 50 μ l に EDTA (終濃度 20 mM) を添加し、ドットブロット解析用のロードサンプルとした。タンパク質定量のために、精製してきた組み換えタンパク質を検量線用のロードサンプルとして使用した。

2.10 クロスリンク解析

ミトコンドリア 55S リボソーム (46 pmol) と 5 倍量の ICT1 を 100 μ l buffer (20 mM Hepes-KOH [pH 7.6], 8.2 mM MgSO_4 , 80 mM NH_4Cl) 中で混合した。30 $^\circ\text{C}$ 、20 分のインキュベーションを行うことで ICT1/リボソーム複合体を形成させ、その後、アミノ基反応性クロスリンク剤 BS³ (Bis[sulfosuccinimidyl]suberate, Thermo Scientific) を添加し (最終濃度 4 mM)、25 $^\circ\text{C}$ 、30 分でクロスリンク反応を行った。クロスリンク反応は SDS-PAGE loading dye の添加により止め、Western blotting によってクロスリンク産物を解析した。

2.11 Western blotting 解析

SDS-PAGE の後、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に転写した。1 次抗体反応は以下の条件で、blocking buffer (PBS、1% スキムミルク、0.1% Tween 20) の下で行った。感度が低い場合は Can Get Signal (TOYOBO) を使用した。

1次抗体	希釈率	温度	時間
ICT1	1/4000	25 °C	2 時間
	1/4000	4 °C	14-20 時間
ArfB	1/1000	25 °C	2 時間
EF-G1mt	1/1000	25 °C	14-20 時間
RRFmt	1/1000	25 °C	14-20 時間

2次抗体として anti-Rabbit IgG (Sigma) を用い、希釈率 1/5000、25 °C、1 時間の反応条件で反応を行った。検出は ECL (GE Healthcare) を用い LAS4000 によって解析を行った。

ICT1、ArfB、EF-G1mt、RRFmt に対するポリクローナル抗体は、精製組み換えタンパク質をウサギに免疫させることで作成した。

3 結果

3.1 ミトコンドリア 55S リボソームにおける ICT1 の機能解析

3.1.1 55S リボソームの Western blotting 解析

ICT1 はミトコンドリアリボソームタンパク質と考えられており、大サブユニットのタンパク質 MRPL58 として同定されている (Richter et al., 2010; Koc et al., 2013)。そこで、本研究で調製したミトコンドリア 55S リボソームに ICT1 が含まれているか確認するために、55S リボソームについて ICT1 抗体を用いた Western blotting を行った。組み換えタンパク質として精製した ICT1 を用いて、リボソーム中の ICT1 の結合量を定量した。その結果、ICT1 はミトコンドリアリボソームに 1:1 の化学量論比で存在することが分かった (図 8A)。さらにミトコンドリア 55S リボソームおよび 39S 大サブユニットに存在することが確認された (図 8B)。

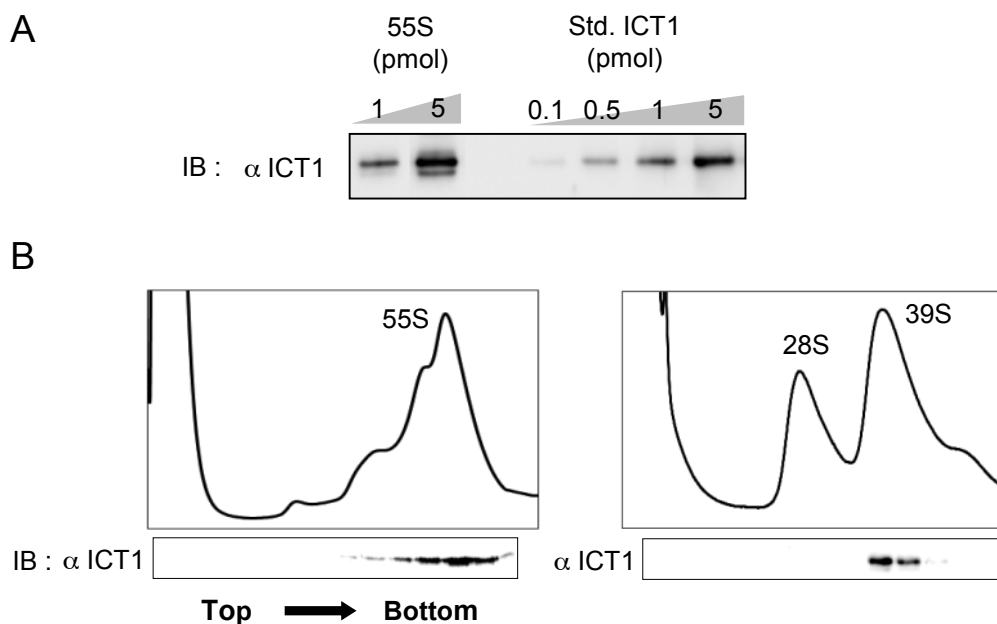


図8 ミトコンドリア55SリボソームのWestern blotting解析

- A: 55Sリボソームに存在するICT1の量をWestern blottingによって解析した。
精製ICT1タンパク質を定量のための標準サンプルとして用いた (Std. ICT1)。
B: 55Sリボソームをショ糖密度勾配遠心法によって分画し、Western blottingによってICT1の局在を解析した。

3.1.2 mRNA 存在下における *in vitro* 55S peptide release assay

上記の 55S リボソームを用いて、ICT1 のペプチド解離活性を調べた。ペプチジル tRNA のモデルとして N-acetyl-[³H]Phe-tRNA^{Phe} (ac[³H]Phe-tRNA^{Phe}) を用いた。また鋳型として、中心に MF-UAA (stop) または MFV (sense) をコードする約 60 ヌクレオチドの mRNA を使用した。従って、リボソーム/mRNA/ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} 複合体はリボソーム P-site に ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} が結合し、A-site に終止コドンまたはセンスコドンが存在するように設計された (図 9A)。

通常、リボソームの精製過程において、リボソームに対する様々な損傷や、不純物の付着などが避けられず、精製してきたリボソームの 100%が翻訳能を維持することはできない。大腸菌 70S リボソームでさえ、*in vitro* タンパク質合成系で翻訳活性を持つリボソームは約 1 割程度と考えられている。そこで予備実験として、55S リボソームに関して、55S、mRNA、ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} から成る 3 者複合体の形成能を調べた。20 pmol 55S リボソーム、200 pmol mRNA (50 μl 反応系) に対し様々な量の ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} を加え、形成された 3 者複合体の量を解析した。その結果、リボソームと当量の ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} の存在下で、0.9 pmol の ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} がリボソームに結合しており (図 9B)、反応系の全リボソームのうち、約 5%のリボソームが ac[³H]Phe-tRNA^{Phe}、mRNA と複合体を形成できることが分かった。

上記の実験を基に、3 者複合体 (55S リボソーム/mRNA/ac[³H]Phe-tRNA^{Phe}) において、ICT1 やその他のミトコンドリアペプチド解離因子を反応系に添加し、リボソーム複合体から解離される ac[³H]Phe の量を解析した (図 9C)。結果の値は、ペプチド解離因子を加えていない時の値をバックグラウンドとして引き、また、3 者複合体におけるすべての ac[³H]Phe-tRNA^{Phe} が加水分解された時の値を 100%として表記した。

結果として、終結因子 RF1Lmt の存在下では、A-site に終止コドンが存在するときのみペプチド解離活性が見られた (図 9C)。また、機能が明らかになっていない RF1mt については、これまでの報告 (Nozaki et al., 2008; Soleimanpour-Lichae et al., 2007) と同様、ペプチド解離活性は検出されなかった。一方で、ICT1 の存在下では、A-site のコドンに関係なくペプチド解離活性が見られた。予想外の結果として、ICT1 は 100%をはるかに超える値となった。

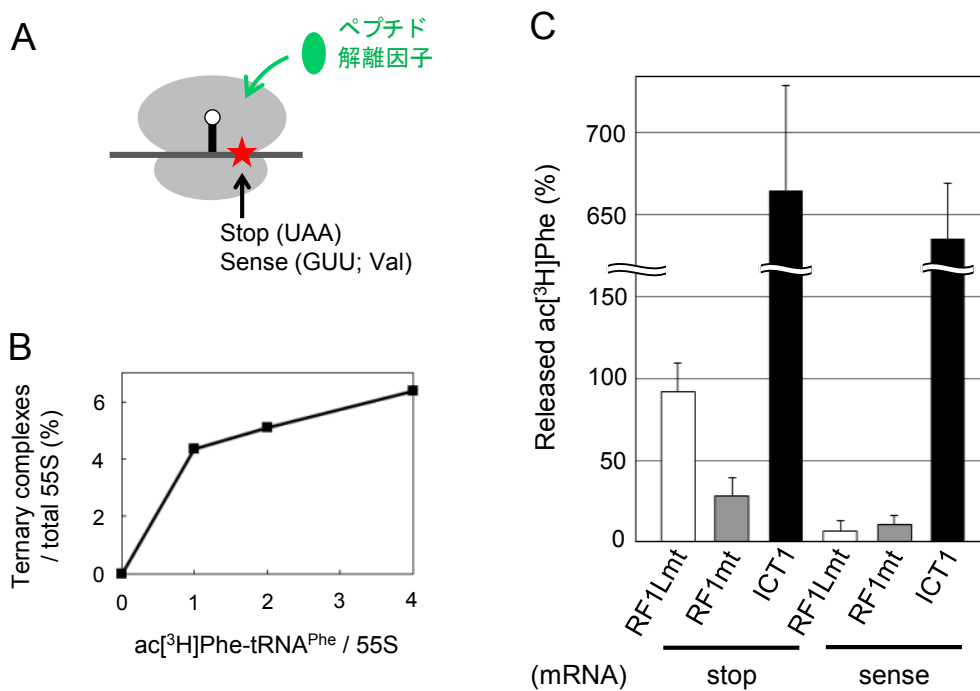


図9 mRNA存在下における*in vitro* 55S peptide release assay

A : *in vitro* 55S peptide release assay の実験概要。

B : 55Sリボソームの55S/mRNA/ac^[3H]Phe-tRNA^{Phe}複合体形成能の解析。

20 pmol 55Sリボソーム、200 pmol mRNA (50 μl反応系) に対し、示された量のac^[3H]Phe-tRNA^{Phe}を加え、ニトロセルロースフィルターを用いて、55S/mRNA/ac^[3H]Phe-tRNA^{Phe}複合体を分離した。 [^{3H}]Phe量の測定によりにより形成された複合体の量を解析した。

C : *in vitro* 55S peptide release assay。

55Sリボソーム/ac^[3H]Phe-tRNA^{Phe}/mRNAにおけるICT1およびRF1Lmt、RF1mtのペプチド解離活性を解析した。stop、senseはそれぞれリボソームA-siteに終始コドンまたはセンスコドンが存在することを示す。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3.1.3 mRNA 非存在下における *in vitro* peptide release assay

3.1.3.1 *in vitro* 55S peptide release assay (mRNA 非存在下)

55S peptide release assay では、反応液中の全てのリボソームが mRNA と結合し 3 者複合体 (55S リボソーム/mRNA/ac^{[3]H}Phe-tRNA^{Phe}; 図 9A) を形成できるのではない。予備実験により、3 者複合体を形成できるリボソームは約 5%のみであることが分かった (図 9B)。従って残りのリボソームは mRNA との結合能を持たず、遊離リボソームとして存在すると考えられる。上記 (図 9C) の 100%を超える ICT1 のペプチド解離活性について、mRNA が存在しないリボソームにおいて ICT1 は ac^{[3]H}Phe-tRNA^{Phe} と反応したと推測した。

mRNA が存在しない場合、ac^{[3]H}Phe-tRNA^{Phe} は安定にリボソームに結合できず、複合体として検出することはできない。結合した場合でもその結合時間は非常に短い。さらには、mRNA が存在しないために、tRNA がペプチド解離反応の基質となる適切な配向 (P/P state) を取る時間はほんの一瞬であると推測される。このような mRNA 非存在下のリボソームにおけるペプチドの解離は、これまで、抗生物質 puromycin を用いた時に検出されていた。puromycin はアミノアシル tRNA の 3'末端のアナログとして働く抗生物質である (Nissen et al., 2000)。リボソームの A-site 近傍に結合し、P-site のペプチジル tRNA からペプチドが転移され、peptidyl-puromycin となってリボソームから解離することで、ペプチドの解離を引き起こす。Puromycin は、mRNA 非存在下のリボソームにおいて ac^{[3]H}Phe-tRNA^{Phe} の加水分解を行い、この反応は、ac^{[3]H}Phe-tRNA^{Phe} が反応系に存在する限り続く。一方で、厳密に活性が制御されたペプチド解離因子の場合では、mRNA 非存在下のリボソームにおいてペプチジル tRNA の加水分解が起こるとは考えにくい。しかし上記の結果から、ac^{[3]H}Phe-tRNA^{Phe} がリボソームに不安定に結合する場合にも、ICT1 はペプチド解離活性を示すと推測した。

そこで、mRNA を添加せずに図 9C と同様の実験を行った (図 10A)。予想通り、ICT1 のペプチド解離活性が検出された。さらに mRNA 非存在下における ICT1 の活性は 55S リボソーム依存的であることが確認された (図 10A, 55S[-])。またこのような活性は終結因子 RF1Lmt および RF1mt では検出されなかった。

さらに、リボソーム単独の場合のペプチド解離活性は見られず (図 10A, RF[-])、外来の ICT1 を添加した時のみ (図 10A, ICT1) ペプチド解離活性が検出された。すなわち、リボソームタンパク質として存在する ICT1 はペプチド解離反応には関与しないことが示された。リボソームタンパク質として存在する ICT1 はペプチド解離活性部位とは異なる位置に結合していることが推測される。

3.1.3.2 *in vitro* 70S peptide release assay (mRNA 非存在下)

同様の実験を大腸菌オーソログ ArfB について行った (図 10B)。大腸菌 70S リボソームにおける $ac[{}^3H]Phe-tRNA^{Phe}$ のペプチド解離活性を調べたところ、ArfB の mRNA 非存在下におけるリボソーム依存的なペプチド解離活性が検出された。また同時に ICT1 についても、55S の場合と同様にペプチド解離活性が検出された。これより、mRNA 非存在下のリボソームにおけるペプチド解離活性は、ICT1/ArfB family に共通した特徴であることが分かった。

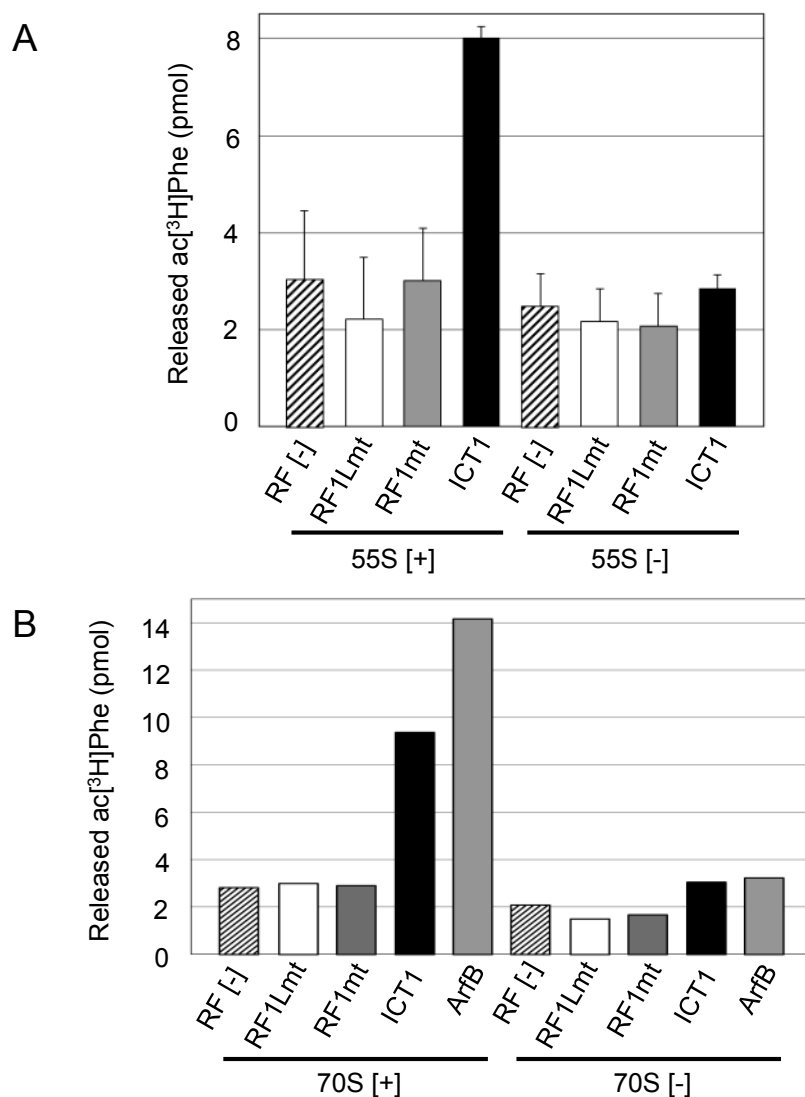


図10 mRNA非存在下における*in vitro* peptide release assay

A: 55Sリボソーム/ $ac[{}^3H]Phe-tRNA^{Phe}$ において、ICT1およびRF1Lmt、RF1mtのペプチド解離活性を解析した。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。
 B: 70Sリボソーム/ $ac[{}^3H]Phe-tRNA^{Phe}$ におけるICT1およびArfBのペプチド解離活性を解析した。55S [+], 70S [+] はリボソーム存在下、55S [-], 70S [-] はリボソーム非存在下における結果を示す。

3.1.4 55S リボソームにおける内在性 ICT1 と外来因子の結合競合性解析

3.1.4.1 His-ICT1 の 55S リボソームへの結合解析

In vitro 55S peptide release assay によって、リボソームタンパク質として存在する ICT1 はペプチド解離反応に関与せず、外来の ICT1 がリボソームに結合することでペプチド解離反応を行うことが分かった。ここで、ICT1 がリボソームタンパク質として 55S リボソームに存在している状況に対して、外来の ICT1 がさらに結合し得るのか、すなわち 1 つのリボソームに対して 2 つの ICT1 が結合し得るのか、という疑問が生じた。そこで、リボソームタンパク質として存在する ICT1 と外来 ICT1 が同一リボソーム上で共存することができるかを Western blotting によって解析した (図 11)。55S リボソーム中の内在性 ICT1 と外来 ICT1 を区別するために、外来 ICT1 として N 末端側 His タグ付き ICT1 を用いた。SDS-PAGE において、His タグの分子量の増加に従って、His-ICT1 は内在性 ICT1 と移動度において区別できる。55S リボソームに対して 17 倍量の His-ICT1 を添加し、複合体を形成させた。その後、ショ糖密度勾配遠心法によって分画し、各フラクションについて ICT1 抗体による Western blotting を行った。結果として、リボソームタンパク質由来の内在性 ICT1 と外来由来 His-ICT1 のリボソームにおける同時の結合が見られた (図 11、右上)。

リボソームタンパク質として存在する内在性 ICT1 と外来 ICT1 がリボソーム上で同じ部位に結合する場合、55S リボソームに対して過剰量の His-ICT1 の添加は、リボソームタンパク質の ICT1 の解離につながると推測される。今回の結果では、過剰量の His-ICT1 の存在下においても、内在性 ICT1 はトップフラクション (リボソーム非存在画分) に検出されなかった (図 11、右上)。すなわち、リボソームタンパク質の ICT1 と外来由来の ICT1 の結合競合性は見られず、両者のリボソーム上における結合部位は異なると推測される。また、大腸菌オーソログ ArfB はリボソーム A-site に結合することが分かっており (Gagnon et al., 2012)、同様に、外来由来の ICT1 もリボソーム A-site に結合すると推測される。従って、リボソームタンパク質として存在する ICT1 はリボソーム A-site とは異なる位置に結合していることが推察される。Western blotting のバンド強度より、投入した His-ICT1 (リボソームの 17 倍量) のうち約 5% がリボソームに結合しているの見積もられ、55S リボソームに対して外来 ICT1 が 1:1 の化学量論比で結合していると推測された。

通常、リボソーム非結合タンパク質は、ショ糖密度勾配遠心分離によりトップフラクションに検出される。今回、55S リボソームに対して過剰量の His-ICT1 を加えたが、トップフラクションにおける完全長の遊離 His-ICT1 はほとんど検出されなかった。引き換えに、His-ICT1 由来の、小さい分子量のバンドが多く検出された (図 11、右上、asterisk)。His-ICT1 は 55S リボソームとの混合により分解され、その分解産物が検出されたと推測される。55S リボソームは精製の過程においてミトコンドリア内膜との分離が難しく、内膜を含む状態

で精製される。そのため精製度が低くプロテアーゼやヌクレアーゼの混入が除外できない。ICT1 はこのような 55S リボソーム由来のプロテアーゼによって分解されたと考えられる。ICT1 のリボソームへの結合には C-tail 領域が必須であることがわかっている。分解産物のリボソームへの結合は見られなかったことから、55S リボソームとの混合による His-ICT1 の分解は、ICT1 の C 末側から生じていると推測される。

3.1.4.2 A-site 結合翻訳因子の 55S リボソームへの結合解析

次に、His-ICT1 と同様にして、ミトコンドリア固有の A-site 結合翻訳因子を用いて、リボソーム中の ICT1 の結合解析を行った。55S リボソームに対して 15 倍量の A-site 結合ミトコンドリア翻訳因子を加え、各因子の結合を Western blotting によって解析した(図 11、下)。A-site 結合因子として翻訳伸長過程でトランスロケーションを行う EF-G1mt (80 kDa)、リボソーム再生過程でリボソーム解離に関与する RRFmt (23 kDa) を用いた。結果として、His-ICT1 の場合と同様に、A-site 結合翻訳因子とリボソームに存在する ICT1 の結合競合性は見られなかった。

以上より、リボソームタンパク質として存在する ICT1 は外来の ICT1 が結合する A-site とは異なる位置に結合していることが示唆された。

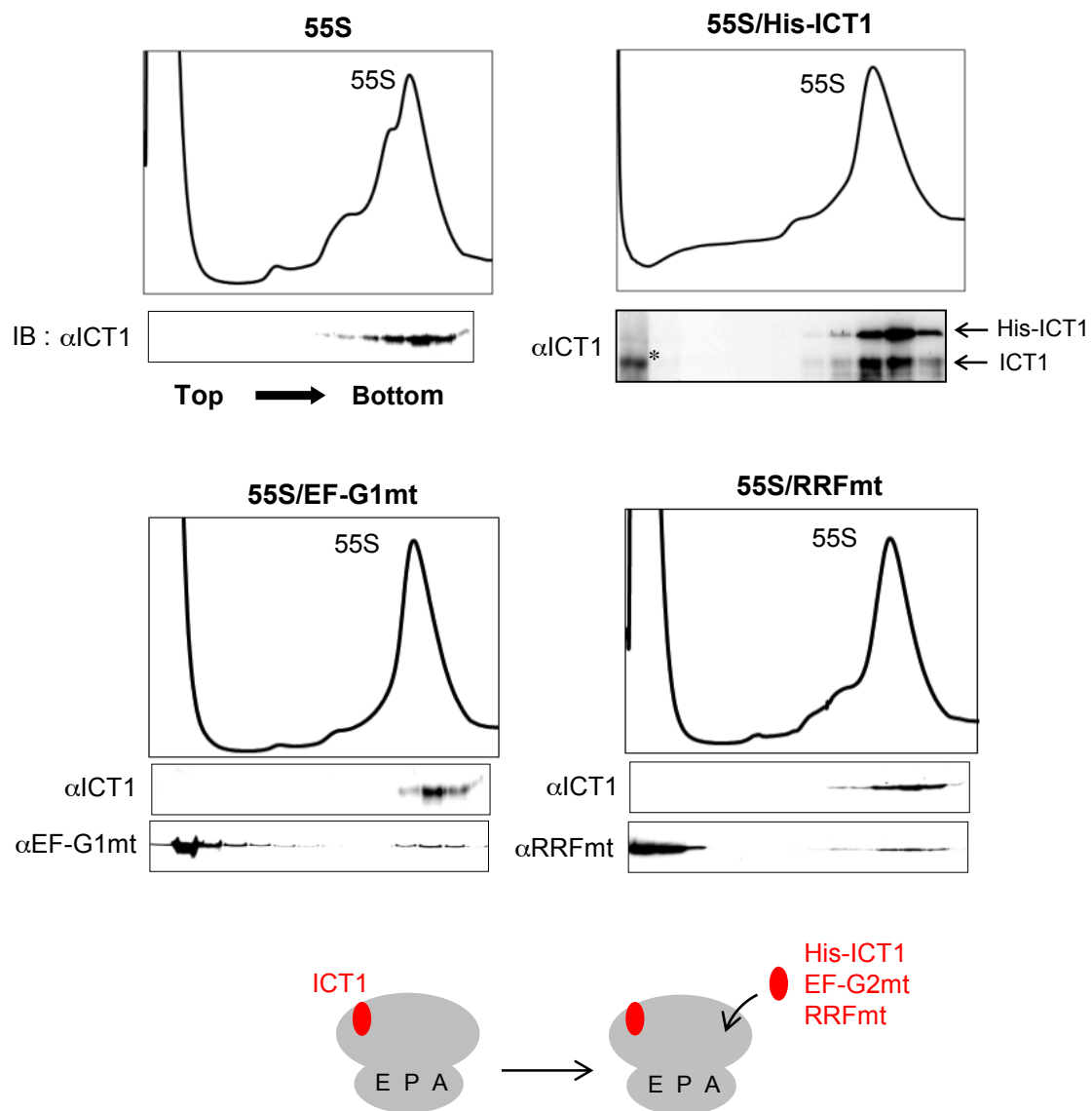


図11 55SリボソームにおけるHis-ICT1とA-site結合翻訳因子の結合解析
 55Sリボソーム単独（左上）、55Sリボソーム/His-ICT1（右上）、55Sリボソーム/EF-G2mt（左下）、55Sリボソーム/RRFmt（右下）をショ糖密度勾配遠心法によって分画した。その後、Western blottingによってリボソームに結合する因子を解析した。右上のパネルにおいて、矢印はリボソームタンパク質として存在する内在性ICT1および外来から結合したHis-ICT1のバンドを示す。

3.1.5 外来 ICT1 のリボソームサブユニットへの結合解析

大腸菌 ArfB は 70S リボソームにおいて、30S 小サブユニットに結合する (Handa et al., 2011)。一方で、リボソームタンパク質として存在する ICT1 はリボソーム 39S 大サブユニットに結合する (図 8)。ICT1 の大サブユニットへの結合は、ミトコンドリアリボソームタンパク質としての特徴であり、外来から結合する ICT1 の場合は、ArfB と同様に、リボソーム小サブユニットに結合すると考えられる。そこで、リボソームサブユニットに対する ICT1 の結合を解析した。

2 mM MgCl₂ の条件下でサブユニット化した大腸菌リボソームと ICT1 を混合し、ショ糖密度勾配遠心法による分画後、ICT1 抗体による Western blotting によってリボソームサブユニットへの ICT1 の結合を解析した (図 12A)。その結果、ICT1 は 30S 小サブユニットに結合した。大腸菌 ArfB の C-tail 領域はリボソームへの結合に必須であり、リボソーム小サブユニットと相互作用することが知られている (Gagnon et al., 2012; Handa et al., 2011)。このため、リボソームがサブユニットに解離している場合には、C-tail 領域を通じて、ArfB はリボソーム小サブユニットに結合する。この性質は ICT1 でも同様であり、外来から結合する ICT1 はリボソーム小サブユニットに結合することが分かった。

同様にミトコンドリア 55S リボソームにおいても解析を行った。2 mM MgCl₂、200 mM KCl、2 mM GDP の条件下でサブユニット化したミトコンドリアリボソームと His-ICT1 を混合し、同様に Western blotting で解析した (図 12B)。しかし、外来から加えた ICT1 の分解産物のみが可用性画分のトップフラクションに検出され、28S、および 39S サブユニットへの結合は検出できなかった。またこれまでの実験 (図 11) と同様に、分解産物のリボソームへの結合は見られなかった。大腸菌リボソームにおける結果から、ミトコンドリアリボソームにおいても、C-tail 領域を介して小サブユニットと相互作用すると予想された。しかしミトコンドリアリボソームの場合は、反応に加えた ICT1 の大半が分解され、また、55S リボソームではなくサブユニットになることで ICT1 のリボソームへの結合力が低下したと考えられる。このため、今回用いた ICT1 抗体による Western blotting の感度では、ICT1 のサブユニットへの結合は検出できなかったと推測される。

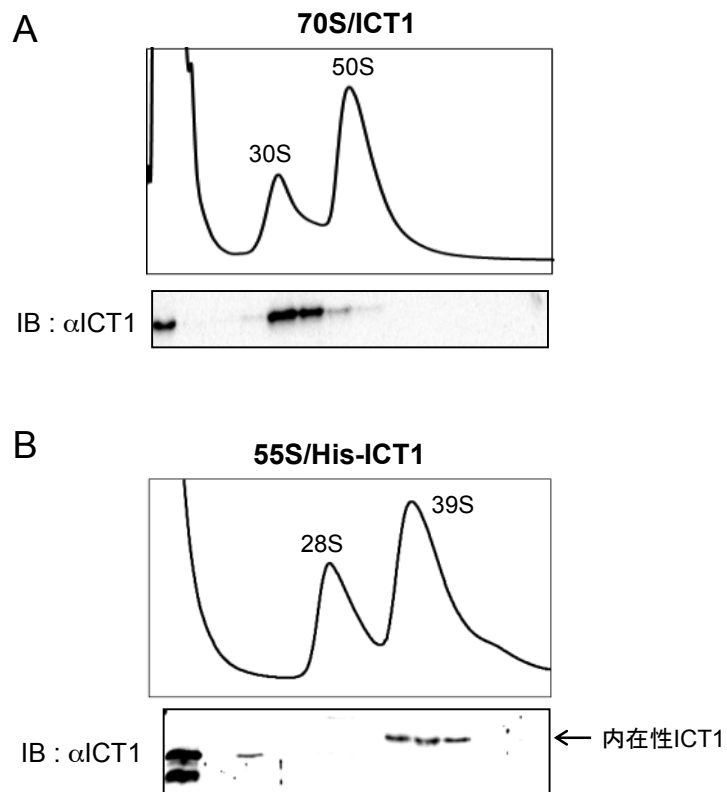


図12 リボソームサブユニットにおけるICT1の結合解析

A: 70SリボソームとICT1を2mM $MgCl_2$ の条件の下で混合し、ショ糖密度勾配遠心法によって分画した。その後、ICT1抗体によるWestern blottingによってICT1のリボソームサブユニットへの結合を解析した。

B: 55SリボソームとHis-ICT1を2mM $MgCl_2$ 、200mM KClの条件の下で混合し、Aと同様に解析を行った。

3.1.6 ICT1/ArfB の細胞内局在解析

細胞抽出液を用いた解析から、ICT1 はミトコンドリアリボソームにのみ局在し、マトリックス画分には存在しないことが報告されている (Richter et al., 2010)。本研究において、豚肝臓由来ミトコンドリア S30 について解析したところ、ICT1 はリボソーム画分に存在し、可溶性画分には検出されなかった (図 13A)。従って先行研究と同様、ICT1 は常にミトコンドリアリボソームに局在していると推測される。

大腸菌オーソログ ArfB に関しては、これまでリボソームタンパク質であるとの報告はされていない。一方で、ポリソームに常に結合しているとの推測もされている (Handa et al., 2011)。大腸菌 ArfB の局在に関する知見を得るため、大腸菌由来 polysome をシヨ糖密度勾配遠心法によって分画し、ArfB 抗体による Western blotting を行った。その結果、ArfB はポリソーム中には局在せず、シヨ糖密度勾配のトップフラクションに検出された (図 13B)。さらに、精製した大腸菌 70S リボソームにも ArfB は存在しないことが確認された (図 13C)。したがって、ArfB はタンパク質合成途中のポリソームには存在せず、通常は遊離タンパク質として細胞内に存在することが示唆された。

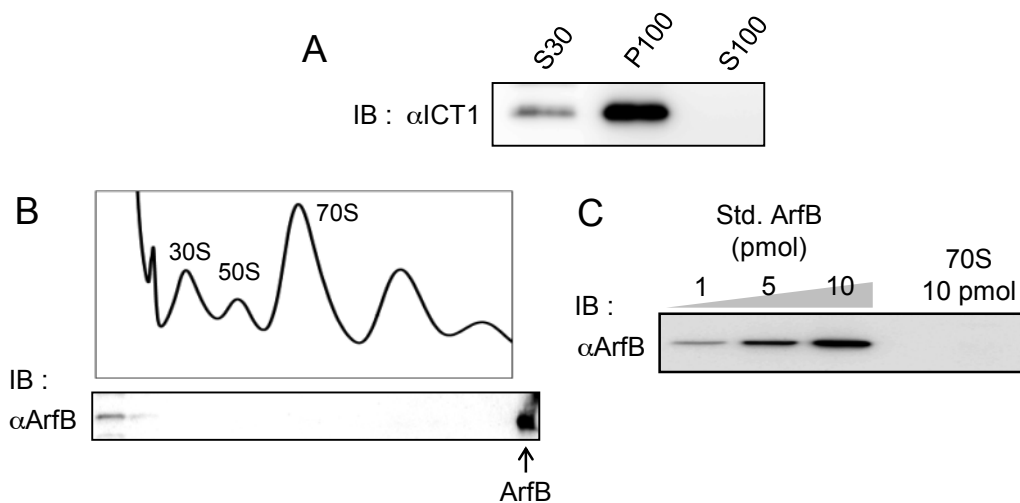


図13 ICT1/ArfBの局在解析

- A: 豚肝臓由来ミトコンドリアS30について、100000×g、2時間の遠心分離により P100 (pellet; リボソーム画分) およびS100 (sup; 可溶性画分) に分画し、ICT1抗体を用いたWestern blottingによって、ICT1の局在を解析した。
- B: 大腸菌polysomeをシヨ糖密度勾配遠心法によって分画し、ArfB抗体を用いたWestern blottingによってArfBの局在を解析した。コントロールとして精製ArfB組み換えタンパク質 (5 pmol) を用いた。
- C: 精製した大腸菌70Sリボソームについて、ArfB抗体を用いたWestern blottingによって解析した。コントロールとして精製ArfB組み換えタンパク質を用いた (Std.ArffB)。

上記の結果から、ICT1 はミトコンドリアにおいて常にリボソームにのみ存在すると推測される。このため、ICT1 がペプチド解離因子として機能する場合には、細胞内における何かしらのシグナルによって ICT1 がリボソームから解離するのではないかと推測した。ここで、ミトコンドリアの機能低下はミトコンドリアマトリックス内の pH 低下を引き起こすことが知られている。そこで pH の低下が ICT1 の解離シグナルとなる可能性について検証した。ミトコンドリア抽出液 S30 を pH7.5 または pH6.0 の条件で処理し、リボソームから解離された ICT1 が検出されるかを Western blotting によって解析した。結果として pH 依存的な ICT1 の解離は検出できず、どちらの pH の場合にも ICT1 はリボソームを含む pellet 画分に検出された (図 14)。

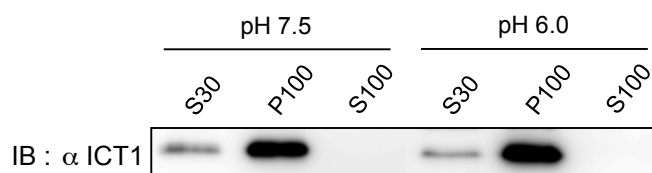


図14 pH依存的なICT1のリボソームからの解離

豚肝臓由来ミトコンドリアのS30を目的のpH条件で処理した後、100000×g、2時間の遠心分離によりP100 (pellet; リボソーム画分) およびS100 (sup; 可溶性画分) に分画した。分画サンプルについてICT1抗体を用いたWestern blottingによってICT1の局在を解析した。

3.1.7 ミトコンドリア 55S リボソームにおける ICT1 の機能解析のまとめ

これまで、ICT1 の機能に関する生化学的解析は全て、大腸菌 70S リボソームを用いたヘテロな系が用いられてきた。本研究では、*in vitro* 55S peptide release assay を通して、ICT1 の機能に関して初めて 55S リボソームを用いたホモの系で機能解析を行った。これによって、ICT1 は 55S リボソームにおいてペプチド解離活性を持つことが示された。

先行研究では、リボソームタンパク質として存在する ICT1 は exit tunnel 近傍の PAS と呼ばれる位置に存在し、このリボソーム中の ICT1 が P-site のペプチジル tRNA に働くことで機能するという機構が推測されていた。これに対し、本研究では、ICT1 を含むリボソームを用いた解析を行うことにより、リボソーム中の ICT1 はペプチド解離反応には関与せず、外来の ICT1 の添加によってのみペプチド解離活性が検出されることが分かった。

また、Western blotting によって His-ICT1 のリボソームへの結合を解析したところ、リボソームタンパク質として存在する ICT1 と外来の His-ICT1 は同一リボソーム上で共存することが示唆され、リボソームタンパク質として存在する ICT1 と外来由来の ICT1 のリボソーム

ムにおける結合部位は異なることが推測された。

通常、終結因子や異常停止解消因子などのペプチド解離因子は mRNA 存在下のリボソームにおいて機能すると考えられてきた。このため、これまで ICT1/ArfB を含むペプチド解離因子の機能解析は mRNA 存在下のリボソームを用いて行われてきた (Nozaki et al., 2008; Handa et al., 2011; Shimizu, 2012; Soleimanpour-Lichaei et al., 2007)。しかし本研究で行った *in vitro* 55S/70S peptide release assay によって、ICT1/ArfB は mRNA が存在しないリボソームにおいてもペプチド解離活性を持つことが示され、ICT1/ArfB はリボソーム P-site において安定した配向をとらないペプチジル tRNA に対しても機能できることが示唆された。

3.2 ICT1 が基質とする異常停止の特徴

3.2.1 *in vitro* multi-round translation assay

3.2.1.1 ICT1 の基質特異性解析

次に、大腸菌由来再構成型無細胞タンパク質合成系 (Shimizu et al., 2001) を用いて ICT1 のペプチド解離活性についてさらなる解析を行った (図 15)。この系は転写、翻訳に必要な因子から構成されており、鋳型 DNA の添加によって転写、翻訳が起こり、タンパク質が合成される。翻訳過程は、大腸菌 70S リボソームを用いた大腸菌由来の系となっている。70S リボソームは内在性 ICT1/ArfB を含まない。このため大腸菌由来タンパク質合成系を用いることは、外来から加えた ICT1/ArfB のペプチド解離因子としての機能を直に反映した解析が行えるという利点がある。反応系からは終結因子などペプチド解離因子を除外し、ICT1 を始めとした解析対象のペプチド解離因子を添加することで、これらの因子の機能を調べた。5 アミノ酸 (MFFLF) をコードした mRNA によるタンパク質合成を行った。3'末端の配列が異なる 3 種類の鋳型を用い、終止コドンおよび 3'UTR を含まない nonstop mRNA、終止コドンおよび 3'UTR (14 ヌクレオチド) を含む stop (UAA) mRNA、終止コドンを含まずセンスコドンおよび 3'UTR (14 ヌクレオチド) を含む stall (AGA) mRNA によるタンパク質合成を行った (図 15 上)。反応系にはフェニルアラニン (Phe, F) およびロイシン (Leu, L) に対応する tRNA およびアミノアシル tRNA 合成酵素のみが存在するため、stall (AGA; Arg) mRNA によるタンパク質合成では対応するアミノアシル tRNA が存在しないため、AGA がリボソーム A-site に来た状態で異常停止 (stall) する。ペプチド合成は、 $[^{14}\text{C}]\text{Met-tRNA}$ と鋳型 DNA の添加によって開始され、 $[^{14}\text{C}]\text{Met}$ の挿入量によってペプチド合成量を評価した。反応系に存在するリボソーム再生因子、EF-G2mt と RRFmt は、P-site にペプチジル tRNA が

存在する場合にはリボソームの解離を引き起こすことができない (Tsuboi et al., 2009)。P-site のペプチジル tRNA が加水分解されることによって、EF-G2mt と RRFmt は働くことができ、リボソームの解離が生じる。これによってリボソームが次の翻訳反応に再利用され、multi-round のペプチド合成が検出される。従って、ペプチドの合成量は ICT1 を含む、ペプチド解離因子の活性を反映した結果となる。

nonstop mRNA によるペプチド合成では (図 15、左下)、リボソームの A-site に mRNA が存在しない状態でペプチド合成は停止する。この場合、ICT1 の添加により multi-round のペプチド合成が検出された。また終結因子 RF1Lmt や機能未知の RF1mt の存在下では single-round のペプチド合成量となり、A-site に mRNA 非存在下の場合の両者のペプチド解離活性は見られなかった。

stop (UAA) および stall (AGA) mRNA によるペプチド合成では (図 15、中央、右下)、リボソーム A-site に終止コドンまたはセンスコドンが存在し、その下流に 3'UTR を含む状態でペプチド合成は停止する。このような状況下では、nonstop mRNA による合成と比較して活性は下がるものの、ICT1 の優位な活性が検出された。終結因子 RF1Lmt の活性は、stop (UAA) mRNA によるペプチド合成においてのみ検出され、反応開始 30 分後において 0.5 μM のペプチド合成量となった。一方で ICT1 の存在下では、stop/stall mRNA の場合、約 0.3 μM 、nonstop mRNA の場合、約 2.0 μM の合成量となった。従って、ICT1 は A-site mRNA 存在下では、A-site 終止コドン存在下における RF1Lmt と同等の活性を持つことが示された。すなわち、ICT1 は mRNA の末端だけでなく mRNA の途中における異常停止の解消においても働くことが示唆された。またすべての場合において RF1mt はペプチド解離活性を示さなかった。

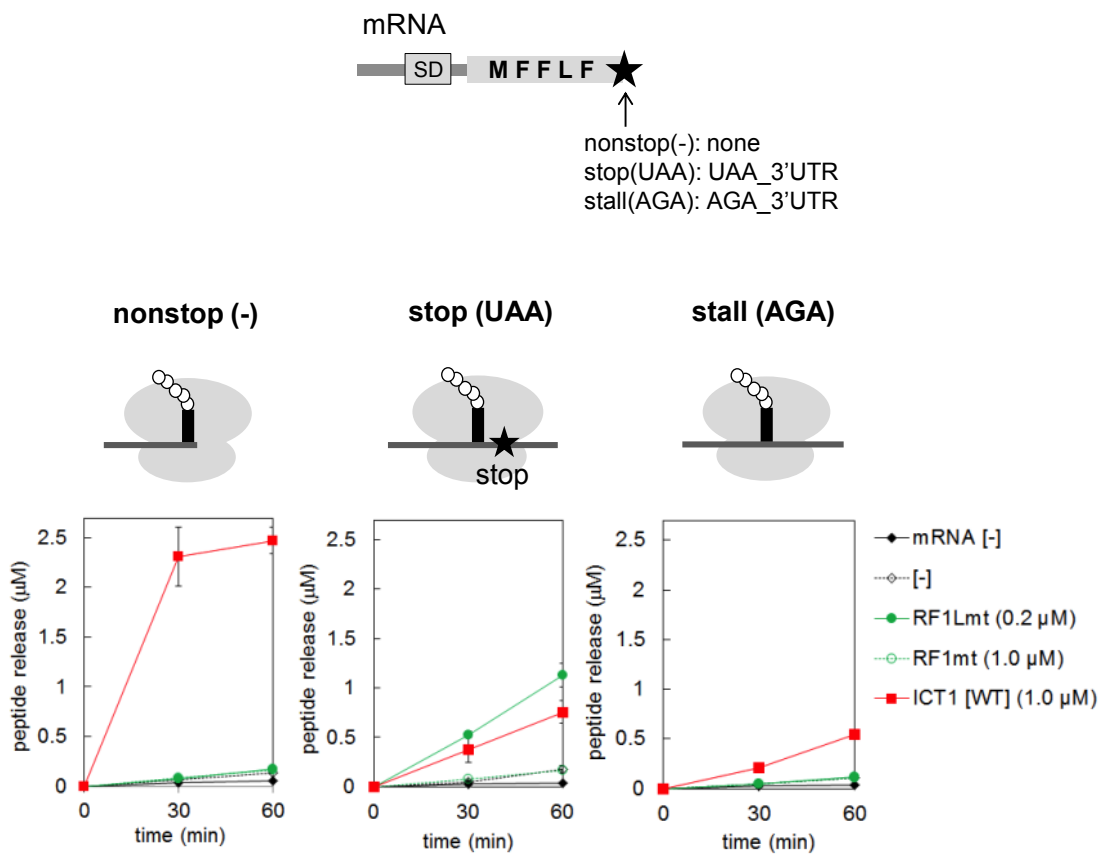


図15 *in vitro* multi-round translation assayによるICT1のペプチド解離活性解析
 70Sリボソームを用いた大腸菌由来無細胞タンパク質合成系において、ICT1およびRF1Lmt、RF1mtのペプチド解離能を解析した。3種類のmRNA（上図）による異常停止複合体について、ペプチド解離活性を調べた。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3.2.1.2 ICT1 は通常の翻訳を阻害しない

上記の実験において、ICT1 はリボソーム A-site およびその下流に mRNA が存在する場合にもリボソームに結合し、ペプチド解離活性を示した。mRNA の途中で異常停止したリボソーム複合体においても働くことができる ICT1 の機能は、リボソーム A-site への結合においてアミノアシル tRNA/EF-Tu と競合することで、通常の翻訳反応の阻害につながりかねない。

そこで、*in vitro* multi-round translation assay において、ICT1 と RF1Lmt との競合性を解析した。この実験では、ICT1 の GGQ モチーフの 1 残基置換変異体であり、ICT1 の活性が消失することが知られている ICT1 [GSQ] を用いた (Richter et al., 2010)。リボソーム A-site に終止コドンが存在する場合、過剰量の ICT1 [GSQ] の添加は、RF1Lmt の活性に影響を及ぼさなかった (図 16A)。すなわち A-site に終止コドンが存在する場合は RF1Lmt が優先的にリボソームに結合し、ICT1 の結合は競合しないことが示唆された。

この結果は、通常の翻訳の場合にも適用できる。リボソーム A-site においてコドン-アンチコドン相互作用を持つアミノアシル tRNA が存在する場合は、ICT1 はアミノアシル tRNA と競合せず、A-site のコドンに対応するアミノアシル tRNA が優先的に A-site に結合すると推測される。以上より、ICT1 は A-site に mRNA が存在する場合でもペプチド解離活性を持つが、翻訳反応が正常に行われている場合には、翻訳反応の阻害にはつながらないことが示唆された。

また同時に、過剰量の RF1Lmt の添加は ICT1 の活性には影響を及ぼさず、両者は完全に独立して働くことが改めて示された (図 16B)。

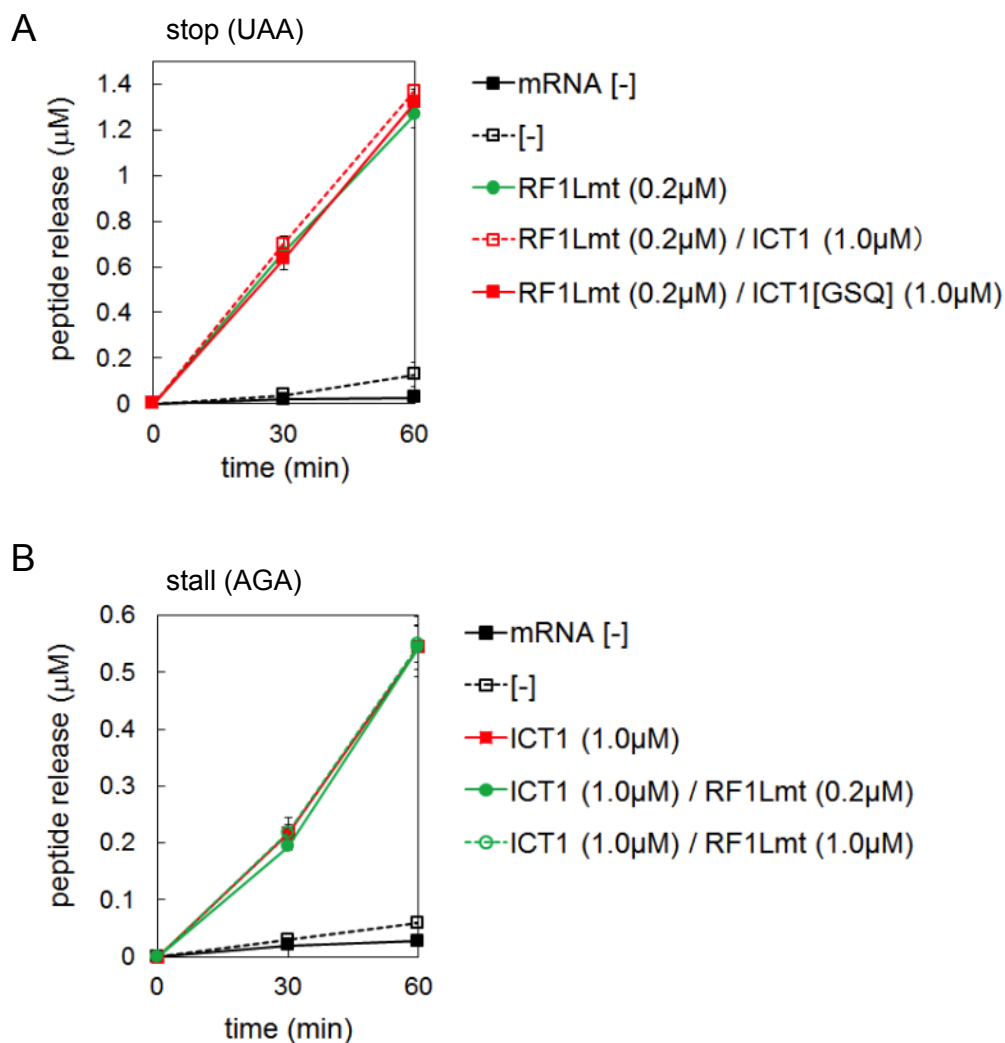


図16 *in vitro* multi-round translation assayによるICT1とRF1Lmtの競合性解析 (ICT1は通常の翻訳反応を阻害しない)

- A: stop mRNAによるペプチド合成において、RF1Lmtの機能に対して、ICT1の添加が与える影響を調べた。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。
 B: stall mRNAによるペプチド合成において、ICT1の機能に対して、RF1Lmtの添加が与える影響を調べた。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3.2.1.3 ICT1 C-tail 領域の基質特異性に与える影響

リボソーム結合 ArfB の結晶構造から、ArfB の C-tail 領域はリボソーム小サブユニットにおいて mRNA entry channel に結合し、mRNA と競合する (Gagnon et al., 2012)。このため、

ArfB は A-site に mRNA が存在しないリボソームにおいて高い活性を示すと考えられている。

そこで、C-tail 領域を欠失させた ICT1 では、A-site mRNA 非存在下のリボソームを好む性質が消失するのではないかと推測した。この可能性の検証のために、ICT1 の C 末側 14 アミノ酸を欠失させた変異体 ICT1 [ΔC]を用いて、3'側の配列の異なる 3 種類の鋳型からのペプチド合成を行った。先行研究において、ArfB の C 末側 10 アミノ酸 (ICT1 の C 末側 14 アミノ酸に一致) の欠失はリボソームへの結合能を失うことが知られている。これと一致して、予備実験において、ICT1 [ΔC]の場合においても、リボソームへの結合能の消失に伴いペプチド解離活性が大きく低下したが、過剰量 (10 μM) の ICT1 [ΔC]の添加により、低いながらもペプチド解離活性を検出することができた。

3 種類の鋳型からのペプチド合成を比較した結果、ICT1 [ΔC]は ICT1 [WT]と同様の基質特異性を示し、A-site に mRNA が存在しないときに最も高いペプチド解離活性が見られた (図 17)。実際、C 末側 14 アミノ酸は mRNA を占有する C-tail 領域のほんの一部にしかすぎず、この領域を欠失させただけでは A-site における mRNA との競合性は変わらないと推測される。一方で 14 アミノ酸の欠失のみでリボソームへの結合能は大きく低下する。このため、mRNA と競合する 14 アミノ酸以上の C-tail 領域を欠失させた変異体では、活性はほとんど検出できないと推測され、解析には利用できなかったと考えられる。

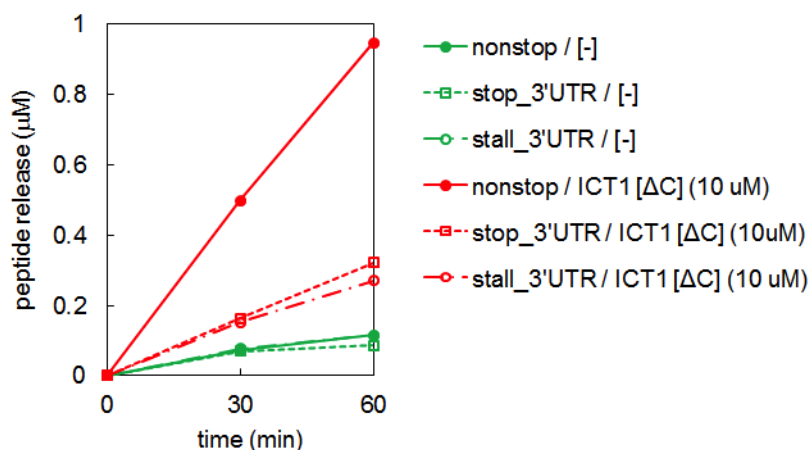


図17 *in vitro* multi-round translation assayによる ICT1 C-tail領域が基質特異性に与える影響の解析

3種類の鋳型によるペプチド合成においてICT1 [ΔC]のペプチド解離活性を解析した。

3.2.1.4 連続したプロリン配列による異常停止に対する ICT1 の機能解析

原核生物、および真核生物細胞質において、ORF (open reading frame) 中に連続したプロリンを含む場合、タンパク質合成が停止することが知られている (Woolstenhulme et al.,

2013)。3つのプロリンの連続は完全に翻訳反応が停止し、2つのプロリンの連続においても多くの場合、翻訳反応が停止する。細胞内においては、EF-P（原核生物）および eIF5A（原核生物）がプロリンの連続による翻訳停止を解消する役割を果たし、このため、これらは連続したプロリン配列を含むタンパク質の発現に必須となっている（Buskirk et al., 2013; Doerfel et al, 2013; Gutierrez et al., 2013; Ude et al., 2013)。原核生物 EF-P と真核生物 eIF5A は tRNA 様構造を持ち、リボソームの E-site と P-site の間に結合し PTC (peptidyl transferase center) に作用することで、A-site のプロリル tRNA によるペプチド転位反応を促進する。

一方で、翻訳終結において終結因子は、全ての配列において同じ速度でペプチドの解離を行うことができるのではなく、翻訳終結反応を阻害する stalling 配列が報告されている。例えば、終止コドンの上流に DTS (Asp-Thr-Ser) 配列が存在する場合、RF1 によるペプチド解離速度は大きく低下する (Woolstenhulme et al., 2013)。

このような背景を踏まえ、連続したプロリンにおける翻訳の停止に対して ICT1 が機能できるかを解析した。In vitro multi-round translation assay において、5 アミノ酸のペプチド合成を行い、鋳型中のプロリン 1~3 個の存在によるペプチド合成量への影響を調べた。3つの連続したプロリンを含む鋳型を用いた場合には (MFPPPstop mRNA) は、終結因子 RF1Lmt の存在下においてシングルラウンドのペプチド合成量を示し、プロリンにおける翻訳停止が生じていることが確認された。

ICT1 の存在下における解析を行ったところ、鋳型中のプロリンの存在は ICT1 の活性に影響を与え、プロリン 1 個の存在下でさえ ICT1 の活性を大きく低下させた (図 18 左)。また、ICT1 の代わりに大腸菌オーソログ ArfB を用いた場合にも、ArfB の活性の低下が見られた。

一方で、通常プロリンの連続による翻訳停止は EF-P の存在によって解消されるはずである。しかし、EF-P を添加はマルチラウンドのペプチド合成にはつながらなかった (図 18 右)。今回用いた EF-P は、無細胞タンパク質合成系において、連続したプロリンを含むタンパク質の合成を促進する効果を持つことが見られており、活性を持つことを確認している。しかし、in vitro multi-round translation assay ではプロリンの連続による翻訳停止を解消する活性は見られなかった。EF-P による効果が見られない原因として反応温度や tRNA の濃度など様々な条件を検討したが、いずれの場合もマルチラウンドのペプチド合成は検出されなかった。

プロリンの挿入位置に関して、終止コドン手前 (図 18) の場合に加えて、開始コドン下流の場合 (MPPPF、MPPLF、MPFLF) についても検討したが、ICT1、EF-P に関する結果は同様となった。

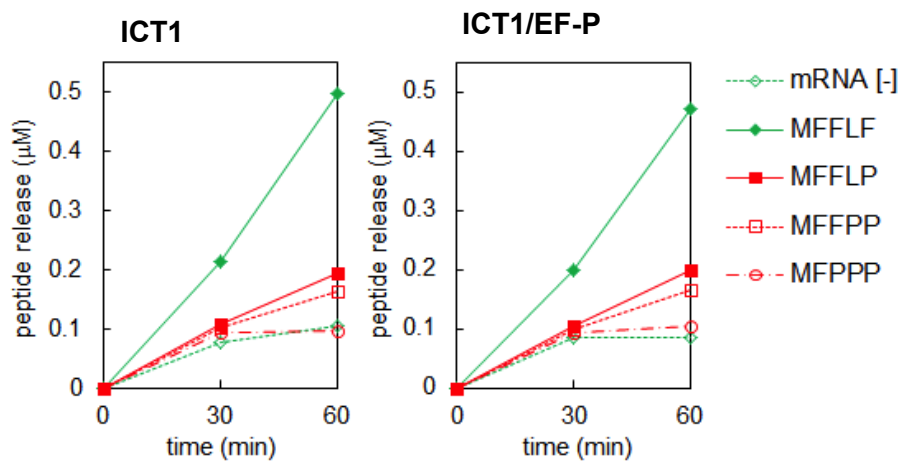


図18 *in vitro* multi-round translation assayによる
Pro連打配列におけるICT1の機能解析

左：Pro連打配列におけるICT1のペプチド解離活性を調べた。

右：EF-P存在下で、Pro連打配列におけるICT1のペプチド解離活性を調べた。

3.2.2 polysome breakdown assay

次に、ICT1 がポリソーム中のポリペプチドの解離にも関与するか否かを、大腸菌由来ポリソームを用いて解析を行った(図 19)。ポリソームは、そのほとんどのリボソームが mRNA の途中にあり、さらに P-site にポリペプチドを有する。3.2.1.1 において ICT1 は mRNA の途中における異常停止に対してもペプチド解離活性を持つことが分かった。polysome breakdown assay によって、mRNA の途中の異常停止における ICT1 の活性についてさらに検証することができ、またポリペプチドの解離活性という点でも解析ができる。反応系にはリボソーム再生因子である EF-G2mt および RRFmt を加えた (Tsuboi et al., 2009)。ペプチド解離因子によってポリソーム中のペプチドが解離されると、EF-G2mt と RRFmt によるポリソームの解離につながる (図 19A)。一方で、ペプチドが解離されず、ペプチジル tRNA がリボソーム上に存在する場合は EF-G2mt と RRFmt によるポリソームの解離にはつながらない。今回、ペプチド解離反応のポジティブコントロールとして抗生物質 puromycin を用いた。puromycin はアミノアシル tRNA の 3'末端のアナログであり、リボソームの A-site 近傍に結合し、ペプチドの解離を引き起こす (Nissen et al., 2000)。polysome breakdown assay において puromycin を添加した場合、ポリソームの減少とモノソーム (70S) およびサブユニット (30S、50S) の増加が見られた (図 19B)。ICT1 を添加した場合、puromycin と同様の結果が見られ、ポリソームの減少とサブユニットおよびモノソームの増加が見られた。従って ICT1 は、mRNA の途中で異常停止したリボソーム複合体においても、puromycin と同等のポリペプチド解離活性を持つことが示唆された。

ポリソーム中のリボソームは、その A-site のほとんどが終止コドンではなくセンスコドン を有すると考えられる。従って RF1Lmt の添加はポリソームの解離にはつながらなかった。また、これまでの実験と一致して、RF1mt についてもそのペプチド解離活性は検出されなかった。

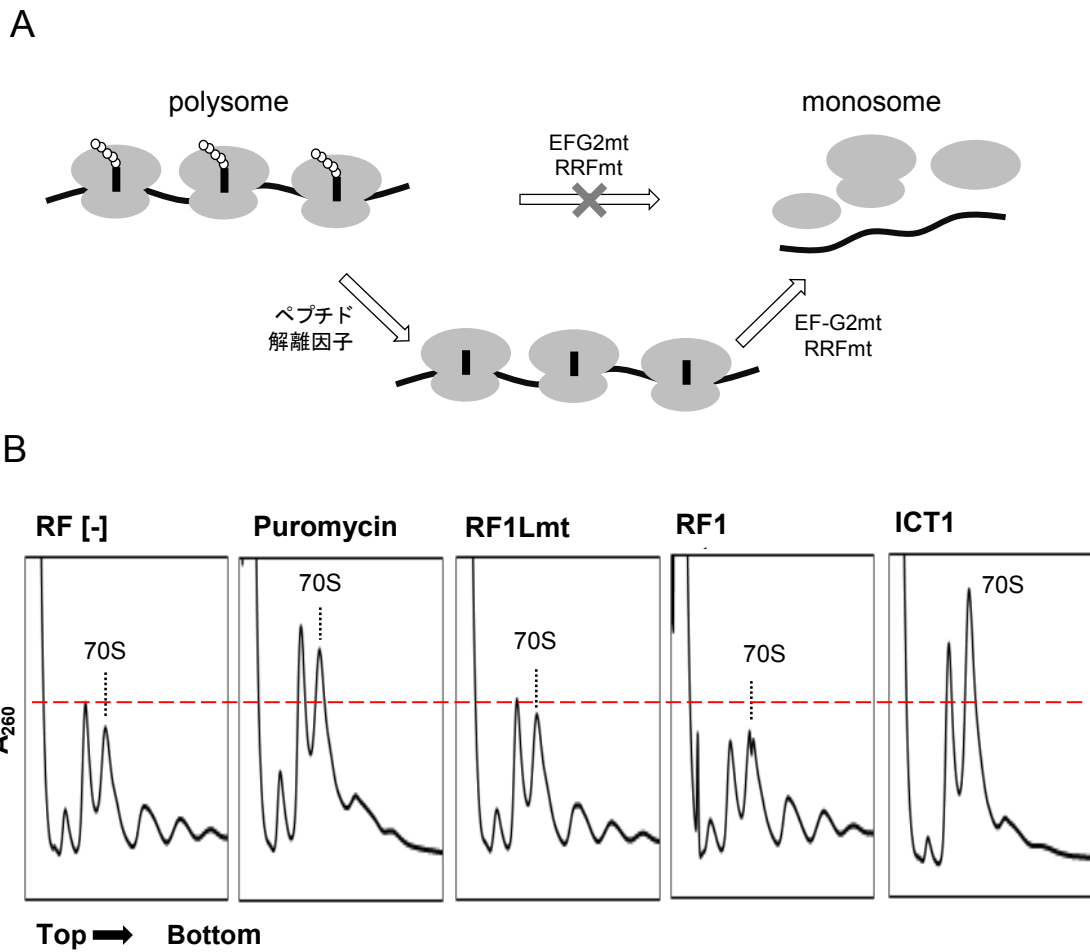


図19 polysome breakdown assay

A : polysome breakdown assayの概略。

B : 大腸菌 polysome における ICT1 および RF1Lmt、RF1mt のペプチド解離活性を解析した。

3.2.3 70S リボソームにおける ICT1 の結合部位解析

先行研究における 70S リボソーム結合 ArfB の結晶構造より、ArfB はリボソーム A-site に結合し、C-tail 領域が 30S 小サブユニットに、N-globular 領域が 50S 大サブユニットに結合する。さらに、C-tail 領域が mRNA entry channel を占有する (Gagnon et al., 2012)。ICT1 と ArfB は同様の構造およびペプチド解離能を持つことから、両者は同様の作用機序でペプチド解離活性を示すと考えられ、ICT1 は ArfB と同様にリボソーム A-site に結合して活性を示すと推測される。一方で ICT1 については、遊離タンパク質の NMR 構造のみが報告されている。

そこで、ICT1 が ArfB と同様に 70S リボソームにおいて A-site に結合することを確認するために、70S リボソームにおける ICT1 と A-site 結合因子の結合競合性を解析した (図 20)。ICT1/70S リボソーム複合体に対して過剰量の A-site 結合ミトコンドリア翻訳因子を加え、各因子の結合を Western blotting によって解析した。A-site 結合因子として、図 11 と同様に、EF-G1mt と RRFmt を用いた。結果として、EF-G1mt および RRFmt のリボソームへの結合は ICT1 の結合を阻害した (図 20)。EF-G1mt を用いた場合は ICT1 の結合は完全に阻害され、RRFmt を用いた場合はわずかに ICT1 の結合が検出された。この結果から、ICT1 は 70S リボソームにおいて A-site に結合し、ペプチド解離活性を示すことが示唆された。

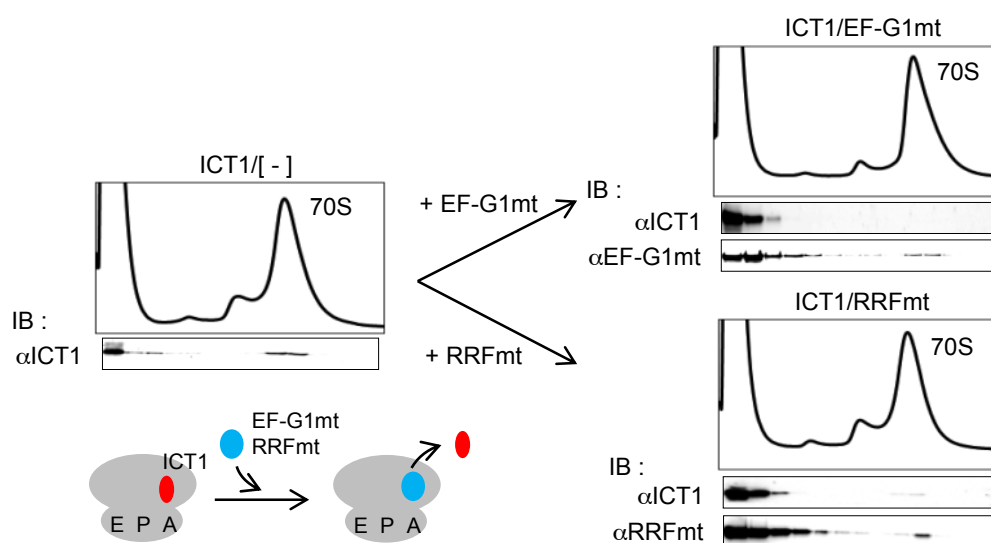


図20 70SリボソームにおけるICT1とEF-G1mt/RRFmtの結合競合性解析
 大腸菌70SリボソームとICT1、EF-G1mt/RRFmtを混合し、ショ糖密度勾配遠心法によって分画した。各フラクションについてWestern blottingを行い、ICT1、EF-G1mt、RRFmtの結合を解析した。反応 (250 μ l) は、0.1 μ Mリボソームに対して、1 μ M ICT1、5 μ M EF-G1mt/RRFmtで行った。

3.2.4 膜挿入途中の異常停止における ICT1 の機能

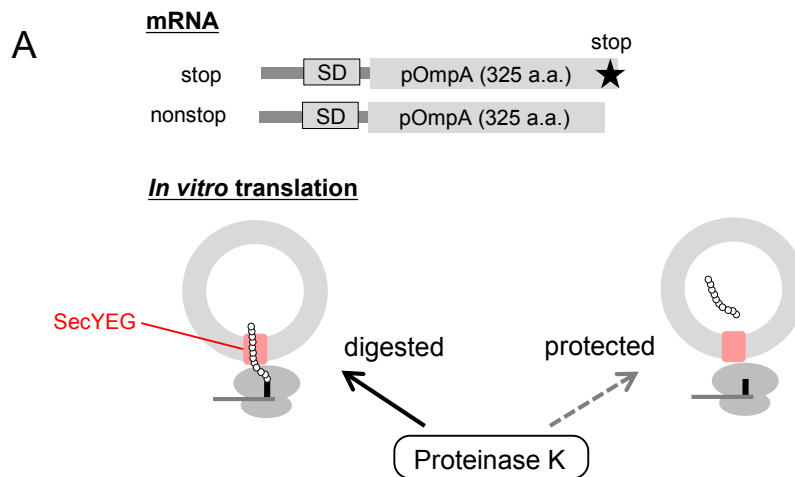
哺乳類ミトコンドリアでは、mtDNA にコードされる 13 個のタンパク質は全てミトコンドリア内膜の呼吸鎖を形成する膜タンパク質であり、これらのタンパク質合成は膜挿入過程と連動して起きると考えられている (Ott and Herrmann, 2010)。従って、ICT1 が基質とする異常停止したリボソーム複合体は膜タンパク質合成途中の異常停止であり、ほとんどの場合、リボソーム exit tunnel から出た新生ペプチドが膜に挿入途中であると推測される。膜挿

入途中の異常停止複合体に対しても 3.2.1 と同様に、ICT1 によるペプチドの解離活性が見られるどうか検証した。

大腸菌由来再構成型無細胞タンパク質合成系を用いて膜タンパク質の合成を行い、膜挿入途中の異常停止に対する ICT1 のペプチド解離活性を調べた。反応系には大腸菌の主要なトランスロコンである SecYEG を含むプロテオリポソームを加えた。鋳型 DNA として、*in vitro* タンパク質合成が容易であり SecYEG の機能解析に多用されてきた大腸菌外膜タンパク質、pOmpA (proOmpA, Outer membrane protein A precursor) を使用した。終止コドンおよび 3'UTR を欠失した mRNA からタンパク質合成を行うことで、リボソームは mRNA の 3' 末端で異常停止 (stall) するように設計された。pOmpA は、secB 非存在下においては膜挿入と連動したタンパク質合成が起こり、SecA 依存的に SecYEG を介して内膜を通過し、外膜のタンパク質となる。SecYEG プロテオリポソーム存在下で pOmpA の合成を行うことで膜挿入と連動した異常停止リボソーム複合体を形成させ、この状態に対する ICT1 のペプチド解離能を調べた (図 21A)。ICT1 が異常停止した pOmpA の解離を行うならば、解離された pOmpA はリボソームの中に放出される。この場合、タンパク質合成後の proteinaseK による処理では、リボソーム内の pOmpA は proteinaseK による分解から守られる。一方で、pOmpA が解離されなかった場合は、proteinaseK 処理によって合成された pOmpA は分解され、全長の pOmpA は検出されない。pOmpA のペプチド解離因子として、ICT1 [WT]に加えて、後に説明する ICT1 のペプチド解離活性消失変異体 ICT1 [GSQ]、ICT1 [$\alpha 2$]、ICT1 [ΔC] および大腸菌オーソログ ArfB について解析を行った。さらに、ArfA/RF2 についても解析した。結果は、SDS-PAGE によって評価し、 $[^{35}\text{S}]\text{Met}$ の取り込みを解析した。合成された pOmpA (ProteinaseK [-]) に対する、分解から免れた pOmpA (ProteinaseK [+]) の割合を透過効率 (%) として表した。

結果として、ICT1/ArfB の存在下では、ProteinaseK による分解から免れた全長の pOmpA のバンドが検出された (図 21B; ICT1 : 51%、ArfB : 49%)。従って膜挿入途中の pOmpA は ICT1/ArfB の働きによりリボソーム複合体から解離され、リボソーム内に放出されたことが示唆された。また、ICT1 の活性消失変異体を用いた場合にはこのような全長のバンドはほとんど見られなかった (図 21B、ICT1 [GSQ] : 14%、ICT1 [$\alpha 2$] : 22%、ICT1 [ΔC] : 15%)。ArfA 存在下では ICT1/ArfB と同様に、分解から免れた pOmpA のバンドが検出された (図 21B、ArfA : 44%)。

以上より、ICT1/ArfB は膜挿入途中の異常停止リボソーム複合体においてもペプチド解離活性を示し、さらに、解離されたペプチドは膜の外側に放出されることが示唆された。



B

mRNA	stop		nonstop													
ペプチド 解離因子	-		-		ICT1		ICT1 [GSQ]		ICT1 [α2]		ICT1 [ΔC]		ArfB		ArfA RF2	
Proteinase K	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
pOmpA																
透過効率 (%)	51	16	51	14	22	15	49	44								

図21 膜挿入途中の異常停止リボソーム複合体におけるICT1の機能解析

A: 膜挿入途中の異常停止リボソーム複合体における、ICT1、ICT1 [GSQ]、ICT1 [α2]、ICT1 [ΔC]、ArfB、ArfA/RF2のペプチド解離能を解析した。

(上) 鋳型mRNAの配列の概略。

(下) 大腸菌由来*in vitro*タンパク質合成系においてSecYEGプロテオリポームの存在下で、pOmpAの合成を行った。タンパク質合成反応後、proteinaseK処理を行い、SDS-PAGEによって評価した。

B: 翻訳産物についてSDS-PAGEによって評価し、[35S]Metの取り込みを解析した。合成されたpOmpA (ProteinaseK [-]) に対する、分解から免れたpOmpA (ProteinaseK [+]) の割合を透過効率 (%) として表した。

3.2.5 ICT1 が基質とする異常停止の特徴のまとめ

先行研究における大腸菌リボソームを用いた ICT1 の生化学的解析では、A-site に mRNA が存在しない nonstop mRNA によるリボソーム複合体、および P-site と A-site に各コドンのみが存在するリボソーム複合体における機能が報告されている (Kogure et al., 2013; Richter et al., 2010)。一方で大腸菌オーソログ ArfB に関しては、A-site 下流の mRNA が長いほどペプチド解離活性が低下することが報告されており、またその理由として、ArfB の C-tail 領域が mRNA entry channel に結合するために、A-site mRNA と競合するためであると考えられている (Gagnon et al., 2012; Shimizu, 2012)。

本研究では *in vitro* multi-round translation assay、polysome breakdown assay を通して、A-site 下流にも mRNA が存在する場合における ICT1 の機能を解析した。その結果、ArfB と同様に A-site 下流の mRNA の存在によって ICT1 のペプチド解離活性は低下するものの、優位なペプチド解離活性を持つことが示された。

また、ICT1 はリボソームへの結合において A-site 結合因子と競合することが示唆され、大腸菌 ArfB と同様に (Gagnon et al., 2012)、外来由来の ICT1 はリボソーム A-site に結合することが示唆された。

3.3 ICT1 の機能部位解析

3.3.1 ICT1 / ArfB 特異的 25 残基挿入領域

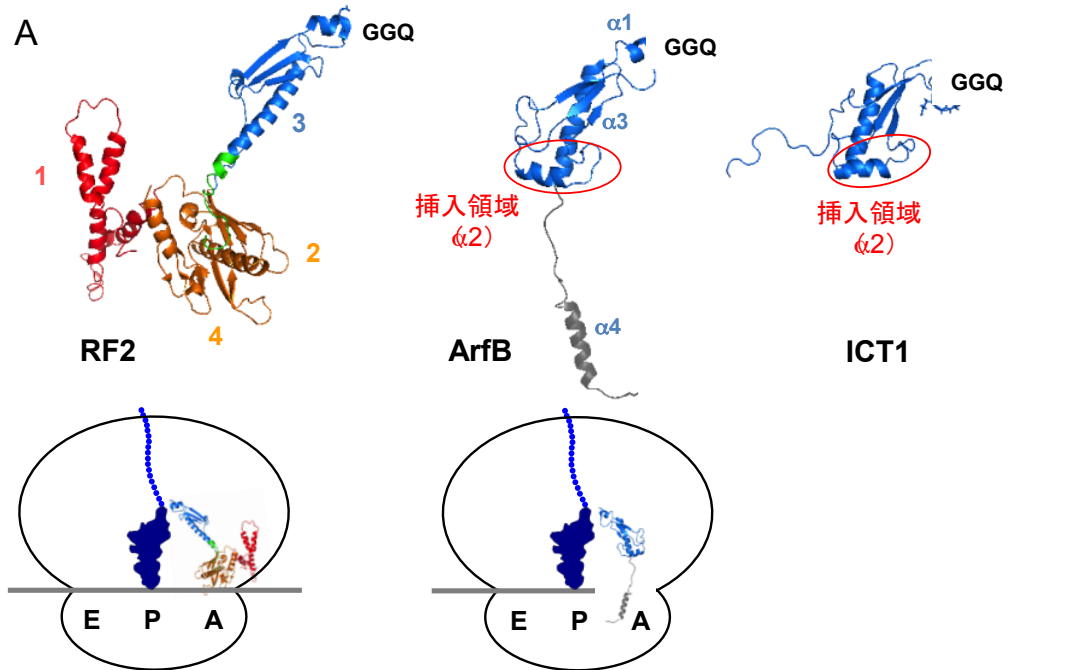
終結因子において、GGQ モチーフを介したペプチジル tRNA の加水分解は厳密に制御されている (Korostelev et al., 2008; Laurberg et al., 2008)。終結因子のドメイン 2 とドメイン 4 を介して、リボソーム A-site の終止コドンが認識される。これにより終結因子全体の構造変化が生じ、GGQ モチーフを活性部位の PTC (peptidyl transferase center) に配置することができる。また、ドメイン 3 とドメイン 4 の間に存在する switch loop は、リボソームとの相互作用を介して GGQ モチーフを適切な配向に固定する (図 4)。

一方で、ICT1 は終結因子のドメイン 3 の領域のみから成り、終結因子におけるコドン認識領域や、switch loop は存在しない (図 7、図 22)。そのため ICT1 の GGQ モチーフの配向がどのように制御され、リボソーム上で適切に配向されているのかは明らかではない。

そこで本研究では、ICT1 や ArfB の N-globular 領域に特異的に存在し、終結因子には存在しない、25 残基の挿入配列 (insertion region) に着目した (図 22)。リボソーム結合 ArfB の結晶構造から、この挿入領域はリボソーム大サブユニット上に結合する (Gagnon et al., 2012)。ICT1 と ArfB における挿入領域のアミノ酸配列保存性は他の領域と比較すると低くなって

いるが、ICT1、ArfB ともに α ヘリックス構造を含む (Kogure et al., 2013)。ICT1 には α ヘリックス構造に続いて 3_{10} ヘリックス構造が形成される。挿入領域と rRNA の相互作用が、GGQ モチーフの固定に重要な役割を果たすのではないかと推測し、変異体を用いた解析を試みた。挿入領域における塩基性アミノ酸をそれぞれアラニンに置換し、1 残基置換した変異体 (R116A、K118A、K124A、K126A、R129A)、および、3 つのアミノ酸 K124、K126、R129 を同時に置換した変異体 (124-126-129A ; $[\alpha 2]$) を作成した (図 22B、C)。

ICT1 のペプチド解離活性には GGQ モチーフが必須であり、この領域の 1 残基置換変異体 ICT1 [GSQ] では ICT1 の活性が消失することが報告されている (Richter et al., 2010)。また、大腸菌オーソログ ArfB において、C-tail 領域がリボソームとの結合に必須であり、C 末側 10 アミノ酸を欠損させた変異体はリボソーム結合能を消失する (Handa et al., 2011)。これらの先行研究と同様に、本研究においても ICT1 の GGQ モチーフに変異を入れた ICT1 [GSQ]、および C 末側 14 アミノ酸 (ArfB の C 末側 10 アミノ酸と一致) を欠損した ICT1 [Δ C] を作成した。挿入領域における変異体に加えて、GGQ モチーフおよび C-tail 領域における変異体を用いて ICT1 の機能解析を行った。



B

E. coli_R	219	-----P-ADLRIDTFRSSGAGGQHVNTTDSAIRITLHLPTG-----	
E. coli_R ₂₂	236	-----P-ADLRIDVVRTSGAGGQHVNRTE SAVRI THLPTG-----	
H. sapiens_RF1Lmt	236	-----P-KDLRIDTKRASGAGGQHVNTTDSAVRIVHLPTG-----	
H. sapiens_RF1mt	297	-----P-KDLRIDTFRASGAGGQHVNTTDSAVRIVHLPTG-----	
E. coli_ArfB	1	--MIVISRHVAIPLDGLLEITAI RAQ GAGGQHVNKTS TAI HLRFDIRASSLPEY-YKERLL	
H. sapiens_ICT1	61	VPNGAKQADSDIPLDR LTISYCRSSGPGGQ NVNVKVN S KA EV RFHLATAEWIAEPV RQ KIA	
		GGQ	挿入領域
E. coli_RF1	253	-----IVVECC Q EDERSOHK NK AKATLSVLGARIHAAEMAKRQ-----	
E. coli_RF2	270	-----IVTQ C NDRSOHK NK DOAMKQ M AKLYELEMOKKNA-----	
H. sapiens_RF1Lmt	270	-----VVSECC Q ERSOLK NK ELAMTKLR A KLYSMHLEEEIN-----	
H. sapiens_RF1mt	331	-----LVVECC Q ERSQIK NK EIAFRVLRARLYQQITTE K DKR-----	
E. coli_ArfB	58	AASH HI ISSDGVIV IK AQ E YRSQ EL N RE AA L ARLV A MIK E LTEK K ARRP TR PTRASKER	
H. sapiens_ICT1	121	ITH K N I NRLGELIL T SESS RY Q F RNLADCL Q KIR D MIT E ASQT P K E P-TKEDV K LHRIR	

E. coli_RF1	-----	
E. coli_RF2	-----	
H. sapiens_RF1Lmt	-----	
H. sapiens_RF1mt	-----	
E. coli_ArfB	118 RLASKAQKSSVKAMRGKVRSGRE----	
H. sapiens_ICT1	180 IENMNRERLRQKRIHS AVKTSRRVDMD	

C-tail

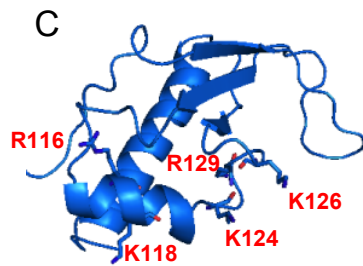


図22 ICT1/ArfBの25残基挿入領域

- A: ICT1/ArfBと終結因子RF2の3D構造比較。挿入領域は赤線で示されている。各構造は図4および図7と同様である。
- B: 終結因子とICT1/ArfBのアミノ酸配列比較。本研究で変異を導入したアミノ酸は赤字で示されている。
- C: ICT1の3D構造における挿入領域の変異導入部位。

3.3.2 ICT1 挿入領域変異体のペプチド解離能解析

3.3.2.1 *in vitro* 55S peptide release assay

はじめに、3.1.3.1と同様にして、mRNA非存在下における*in vitro* 55S peptide release assayによってICT1変異体のペプチド解離活性を調べた(図23A)。その結果、ICT1 [WT]の存在下でのみリボソーム依存的なペプチド解離活性が検出され、挿入領域の3アミノ酸同時置換変異体ICT1 [α 2]では活性が消失した。また、ICT1 [GSQ]およびICT1 [Δ C]を用いた場合にもペプチド解離活性の消失が見られた。この結果は、大腸菌70Sリボソームを用いた場合でも同様となった(図23B)。

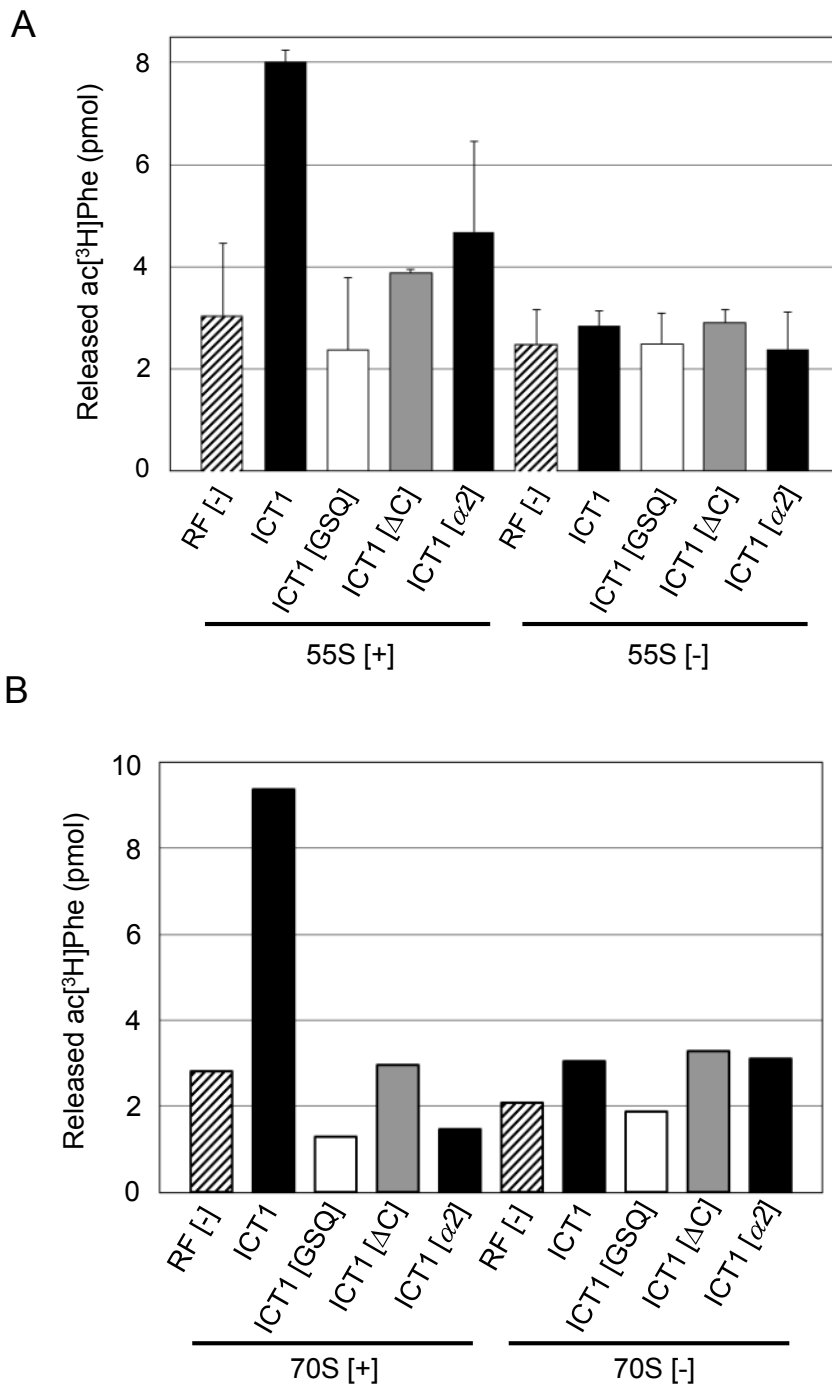


図23 ICT1挿入領域変異体のペプチド解離活性解析
(mRNA非存在下における *in vitro* peptide release assay)

55Sリボソーム/ac³H]Phe-tRNA^{Phe} (A)、70Sリボソーム/ac³H]Phe-tRNA^{Phe} (B) において、ICT1およびICT1 [GSQ]、ICT1 [ΔC]、ICT1 [α2]のペプチド解離活性を解析した。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3.3.2.2 *in vitro* multi-round translation assay

次に、3.2.1と同様に、*in vitro* multi-round translation assayによって、ICT1変異体のペプチド解離活性を解析した(図24)。5アミノ酸MFFLFをコードし、終止コドンおよび3'UTRを持たないnonstop mRNAによるペプチド合成を行った(図24A)。

結果として、ICT1 [WT]の存在下でのみmulti-roundのペプチド合成が見られた。挿入領域変異体ICT1 [α 2]ではICT1 [GSQ]やICT1 [Δ C]と同様にsingle-roundのペプチド合成量となり、活性の消失が見られた。

さらに、ICT1挿入領域における様々なアラニン置換変異体を用いて、*in vitro* multi-round translation assayを行った。ここでは、5アミノ酸MFFLFの後にAGAセンスコドンおよび3'UTR(14ヌクレオチド)を持つmRNAからのペプチド合成を行った(図24B)。1残基置換変異体では影響は小さいもののペプチド解離活性の低下が見られ、3残基同時置換変異体(123-126-129A ; [α 2])では活性は完全に消失した。

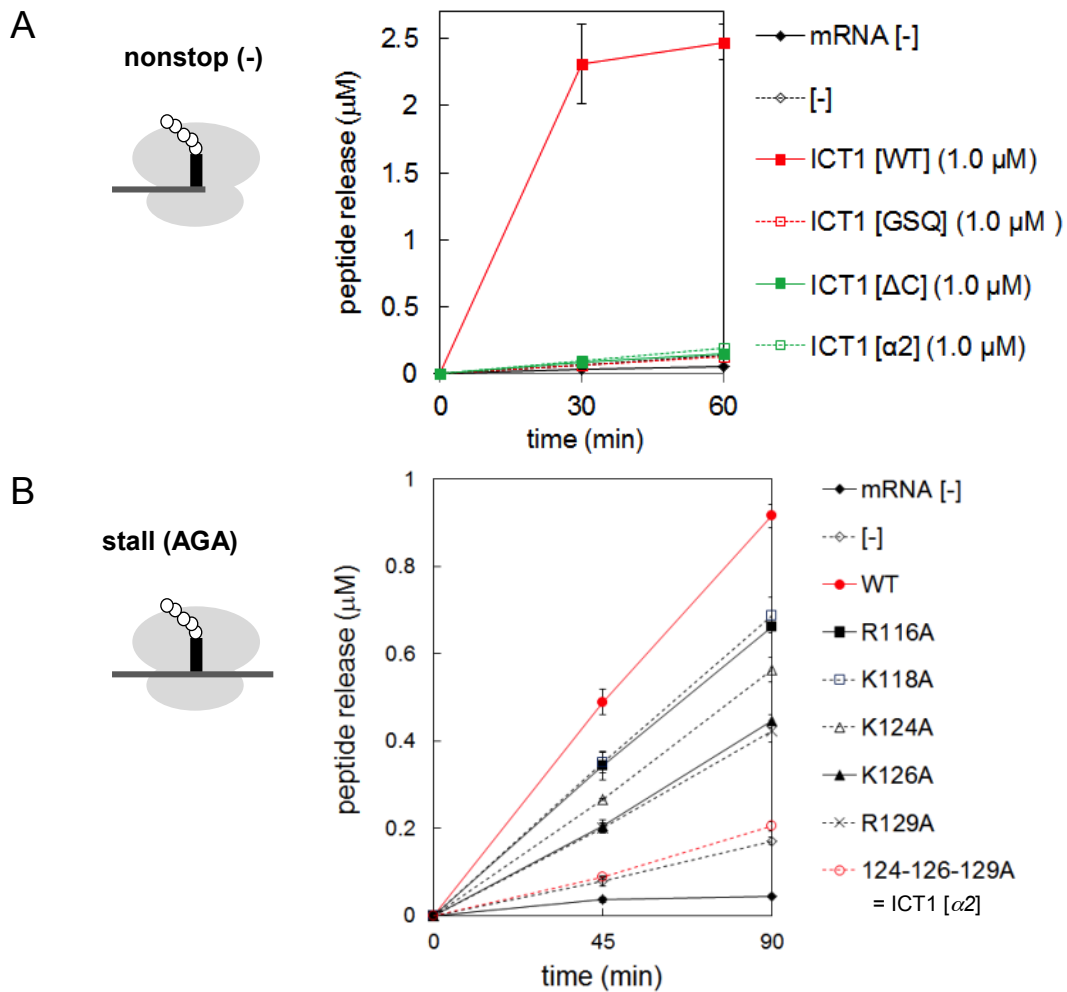


図24 ICT1挿入領域変異体のペプチド解離活性解析
(*in vitro* multi-round translation assay)

A: nonstop mRNAによる異常停止リボソーム複合体における、ICT1およびICT1 [GSQ]、ICT1 [ΔC]、ICT1 [$\alpha 2$] のペプチド解離活性を解析した。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

B: stall mRNAによる異常停止リボソーム複合体における、ICT1およびICT1 [R116A]、ICT1 [K118A]、ICT1 [K124A]、ICT1 [K126A]、ICT1 [R129A]、ICT1 [$\alpha 2$] のペプチド解離活性を解析した。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3.3.2.3 polysome breakdown assay

挿入領域変異体のペプチド解離活性についてさらに検証するために、polysome breakdown assay を行った (図 25)。その結果、55S peptide release assay、multi-round translation assay と一致した結果が得られ、挿入領域変異体 ICT1 [K126A]および ICT1 [$\alpha 2$]では、ICT1 [GSQ]と同様ポリソームの解離は見られず、ペプチド解離活性の消失が確認された。

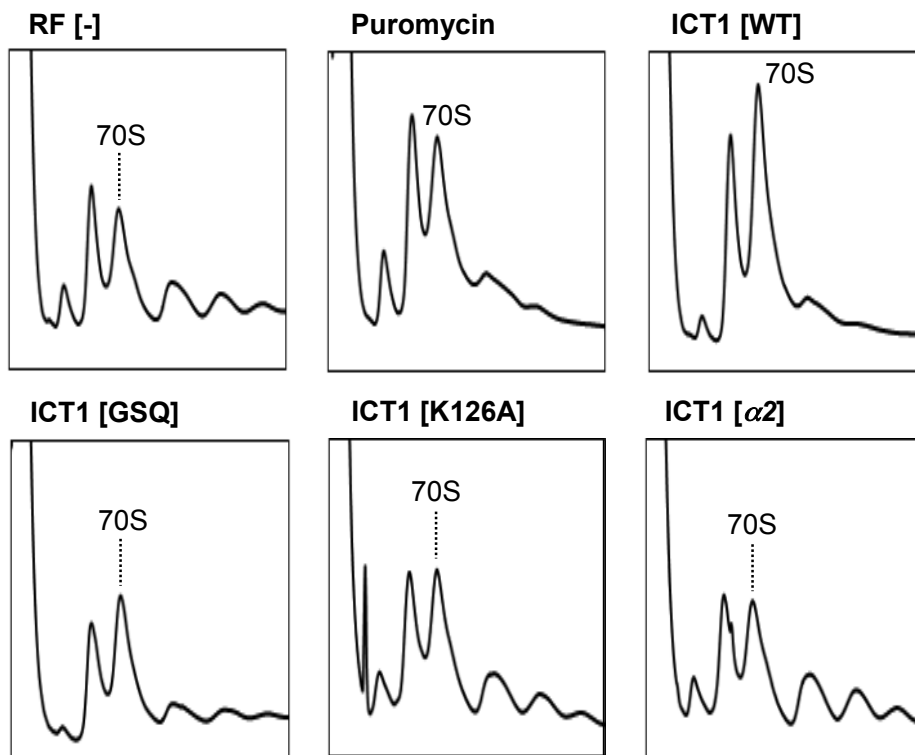


図25 ICT1挿入領域変異体のペプチド解離活性解析
(polysome break down assay)

大腸菌ポリソームにおける、ICT1およびICT1 [GSQ]、ICT1 [ΔC]、ICT1 [K126A]、ICT1 [$\alpha 2$]のペプチド解離活性を解析した。

3.3.3 ICT1 挿入領域変異体のリボソーム結合能解析

3.3.3.1 Western blotting による ICT1 挿入領域変異体のリボソーム結合能解析

ICT1 の挿入領域における変異はペプチド解離活性の消失につながった。変異による活性の消失が、リボソームへの結合能の消失によるものか否かを調べるために、挿入領域変異体のリボソームへの結合能を解析した。ミトコンドリア 55S リボソームに対し 17 倍量の ICT1 [WT]/[$\alpha 2$]を加え、ショ糖密度勾配遠心法によって分画し、Western blotting によって ICT1 の局在を解析した。3.1.4 と同様に、55S リボソームに存在する内在性 ICT1 と外来から加えた ICT1 を区別するために、N 末端側 His タグ付き ICT1 を用いた。結果として、ICT1 [WT]と同様に ICT1 [$\alpha 2$]は 55S リボソームに結合した (図 26)。

投入した ICT1 のうち約 5%がリボソームに結合し、ICT1 はおよそ 1:1 の化学量論比で 55S と結合することが示唆された。3.1.4 の結果と同様に、55S リボソームを用いた解析では、全長の His-ICT1 はトップフラクション(リボソーム非存在画分)にはほとんど検出されず、引き換えに、多量の ICT1 の分解産物が検出された (図 26, asterisks)。この分解産物については、ICT1 [WT]と ICT1 [$\alpha 2$]では同程度に検出された。

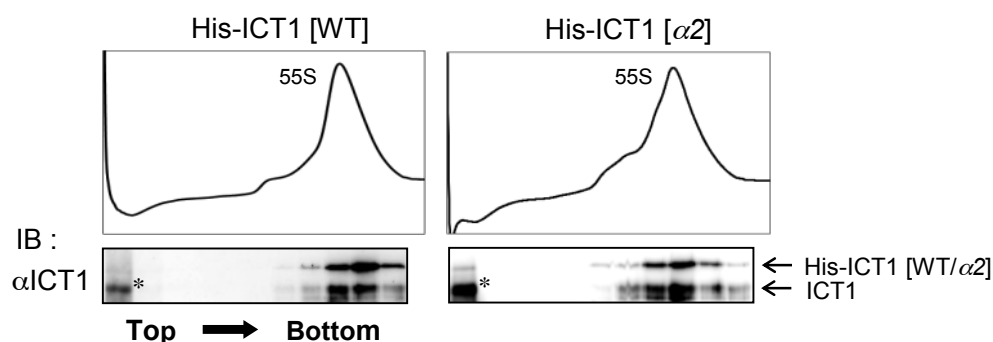


図26 ICT1挿入領域変異体の55Sリボソーム結合能解析

His-ICT1 [WT]/[$\alpha 2$]と55Sリボソームを混合して複合体を形成させた後、ショ糖密度勾配遠心法によって分画した。ICT1抗体を用いたWestern blottingによって、ICT1のリボソームへの結合を解析した。

大腸菌 70S リボソームを用いて同様の結合能の解析を行った。大腸菌 70S リボソームには内在性の ICT1 (ArfB) が含まれておらず、外来から結合する ICT1 の影響のみを解析できる。70S リボソームに対して 10 倍量の ICT1 [WT] または ICT1 [K126A]、ICT1 [$\alpha 2$] を加

え、55S リボソームと同様の解析を行った。その結果 55S リボソームの場合と一致した結果が得られ、挿入領域における変異体 ICT1 [K126A]および ICT1 [$\alpha 2$] は ICT1 [WT] と同様にリボソームに結合した (図 27A)。また、投入した ICT1 のうち約 10%がリボソームに結合し、ICT1 はおよそ 1:1 の化学量論比で 70S と結合することが示唆され、55S の場合と一致する結果となった。

さらにリボソームサブユニットへの結合能について解析したところ、ICT1 [WT]と ICT1 [$\alpha 2$]ともに 30S 小サブユニットへの結合が見られ、サブユニットへの結合能に変化はないことが示唆された (図 27B)。

次に、リボソーム結合能をさらに定量的に解析した。70S リボソームに対して、4 倍量まで様々な量の ICT1 を加え、複合体を形成させた。その後、フィルターを用いて遊離 ICT1 とリボソーム結合 ICT1 を分離し、ICT1 抗体を用いた Western blotting によって、リボソームへの ICT1 の結合量を定量した。結果として、挿入領域変異体 ICT1 [K126A]、ICT1 [$\alpha 2$] は ICT1 [WT] と同様のリボソーム結合能を示した (図 27C)。この実験では、ICT1 の添加量の増加に伴いリボソームに対する ICT1 の結合量 (図 27C、縦軸 ; bound ICT1/70S) が 1 に近づくと想定された。しかし遠心分離を介したフィルターによる分離操作の過程において、ICT1 の濃度増加に伴い、リボソームとともに ICT1 が凝集する傾向が見られた。このためリボソームに対して 4 倍量以上の ICT1 の添加においては正確な結合量を求めることができなかった。

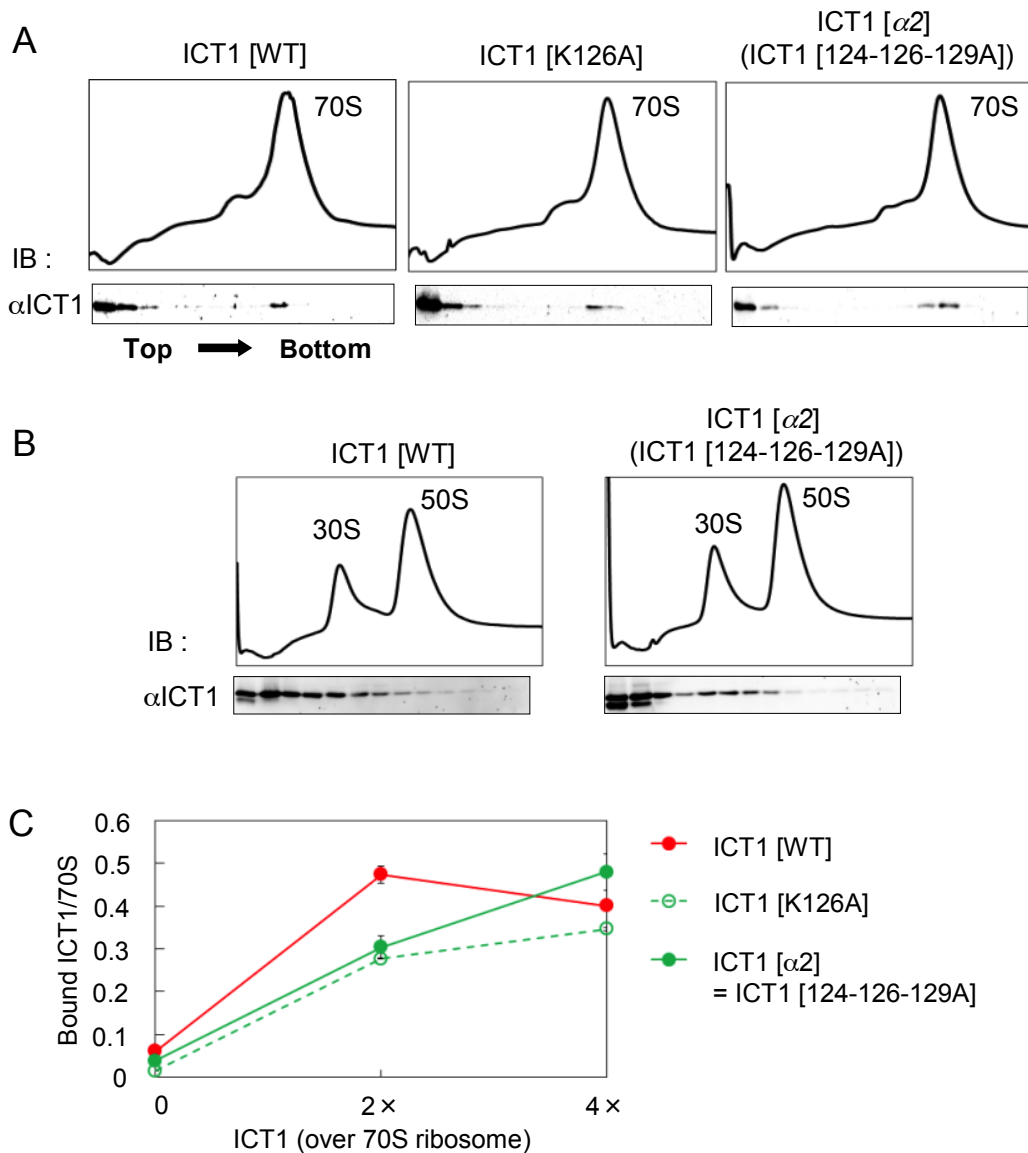


図27 ICT1挿入領域変異体の70Sリボソーム結合能解析

- A: ICT1 [WT]/[K126A]/[$\alpha 2$]と70Sリボソームを混合して複合体を形成させた後、シヨ糖密度勾配遠心法によって分画した。ICT1抗体を用いたWestern blottingによって、ICT1のリボソームへの結合を解析した。
- B: ICT1 [WT]/[$\alpha 2$]と70Sリボソームを2 mM MgCl₂のリボソームサブユニットに解離する条件の下で混合し、複合体を形成させた。その後、シヨ糖密度勾配遠心法によって分画した。ICT1抗体を用いたWestern blottingによって、ICT1のリボソームへの結合を解析した。
- C: 70Sリボソームに対して、4倍量までのICT1 [WT]/[K126A]/[$\alpha 2$]を加えて複合体を形成させた。その後、ICT1抗体を用いたWestern blottingによってリボソームに結合したICT1の量を定量した。ICT1の投入量に対して、リボソームに結合したICT1の量をプロットした。エラーバーは3回の実験の標準偏差を示す。

3.3.3.2 ミトコンドリア 55S リボソームと ICT1 のクロスリンク解析

3.3.3.1 による実験結果から、挿入領域変異体 ICT1 [$\alpha 2$]は ICT1 [WT]と同様のリボソーム結合能を持つことが分かった。しかし、ICT1 [$\alpha 2$]と ICT1 [WT]が、リボソーム上において別の部位に結合している可能性も考えられる。このため、ICT1 挿入領域変異体のリボソーム結合能について、クロスリンク反応によるさらなる解析を行った。ミトコンドリア 55S リボソーム/ICT1 複合体において、アミノ基反応性ホモバイファンクショナルクロスリンカー BS³ (Bis[sulfosuccinimidyl]suberate、図 28A) を用いてクロスリンク反応を行った。55S リボソームに対して 5 倍量の ICT1 を加え、複合体を形成させた。その後 4 mM BS³ を添加しクロスリンク反応を行った。クロスリンク産物は ICT1 抗体を用いた Western blotting によって解析した (図 28B)。

結果として、ICT1 [WT]と ICT1 [$\alpha 2$]で同様のクロスリンクパターンが検出された (図 28B、lane 8、10、two asterisks (**))。two asterisks のバンドに加えて、50 kDa および 70 kDa 以上に外来 ICT1 由来のバンドが検出され、これらは全て ICT1 [WT]と ICT1 [$\alpha 2$]で同様に見られた。従って、ICT1 [WT]と ICT1 [$\alpha 2$]はリボソーム上で同様の相互作用を形成すると推測される。また、ICT1 [WT]と比較して ICT1 [$\alpha 2$]においてバンド強度が弱くなった。挿入領域の変異によって N-globular 領域とリボソーム大サブユニット間の相互作用が弱まっており、クロスリンクの形成効率が異なると推測される。

この実験では、挿入領域変異体のリボソームへの結合能に関する知見を得るとともに、リボソームタンパク質として存在する内在性 ICT1 と外来 ICT1 のリボソーム結合部位の差異に関する知見を得ることも目的とした。リボソーム単独の場合、BS³によるクロスリンクによって、single asterisk (*) のバンドが検出され (図 28B、lane2)、このバンドはリボソームタンパク質として存在する ICT1 由来のバンドであると考えられる。一方で、two asterisks (**) のバンドおよびその他多くのバンドは外来 ICT1 を加えた時のみ検出された (図 28B、lane8)。リボソームタンパク質として存在する ICT1 と外来 ICT1 では異なるクロスリンクパターンが見られ、両者のリボソーム結合部位は異なっていることが示唆された。

リボソームを加えず ICT1 単独の場合では、クロスリンク反応によって、SDS-PAGE の泳動においてサンプルがウェルに詰まる傾向が見られ、スメアなバンドが検出された。ICT1 単独でクロスリンク反応を行うと、凝集する傾向にあり電気泳動に乱れが生じたと考えられる。また、40 kDa 付近に遊離 ICT1 由来のクロスリンク産物が検出された。

クロスリンカーとして、BS³に加えて、DMS (Dimethyl Suberimidate • 2HCl) による反応も行った。しかし、DMS を用いた場合には ICT1-55S リボソーム間のクロスリンク産物は検出されなかった。

またクロスリンク実験では、これまでの実験と同様 (図 11、図 22)、55S リボソームとの混合による外来 ICT1 の分解産物が検出された (図 28B、lane7-10)。

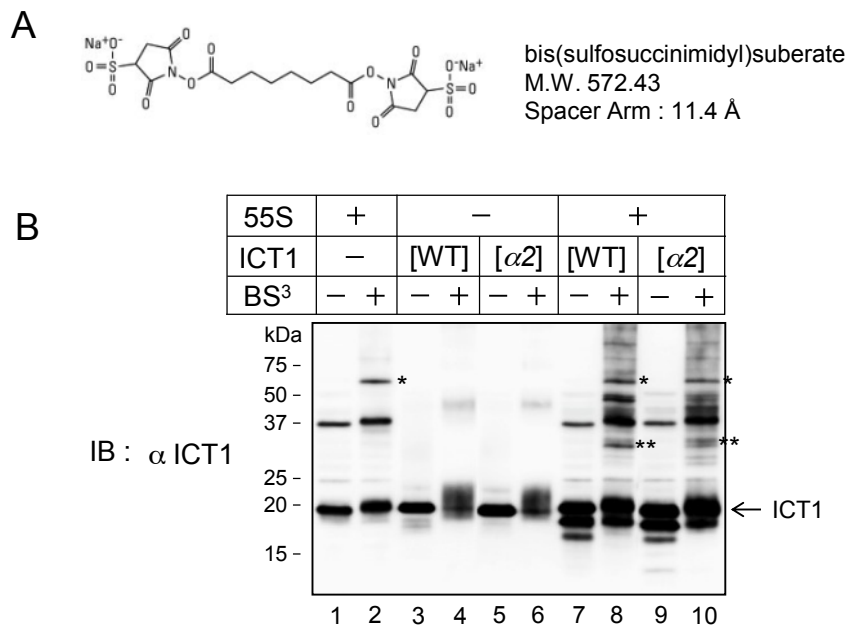


図28 ICT1/55SリボソームのBS³によるクロスリンク解析

A : クロスリンカーBS³の構造。

B : 55Sリボソーム、ICT1、55Sリボソーム/ICT1に対してBS³

(終濃度4 mM) によるクロスリンクを行った。クロスリンク産物についてICT1抗体を用いたWestern blottingを行った。

3.3.4 RF2-ICT1α2 変異体の解析

大腸菌における異常停止解消機構として、ArfA/RF2 による機構が存在する (Chadani et al., 2012; Shimizu, 2012)。終結因子である RF2 は通常、リボソーム A-site の終止コドンに依存してリボソームに結合する。しかし、ArfA の存在によって、RF2 はコドン非依存的なリボソームへの結合が可能となり、終止コドンが存在しない場合でも P-site のペプチジル tRNA の加水分解を引き起こす。ArfA/RF2 の作用機序は未だ明らかになっておらず、ArfA のリボソーム結合部位に関しては、A-site および E-site の両方について議論がされている (Pech and Nierhaus, 2012, Chadani et al., 2012)。

ArfA は約 55 アミノ酸から成る小さなタンパク質である。本研究では、RF2 における ArfA が、ICT1/ArfB に特異的に存在する 25 残基挿入領域と同様の役割を担う可能性を検証した。ArfA は RF2 とともにリボソーム A-site に結合すると考え、ICT1 挿入領域と同様に、RF2 の GGQ モチーフの適切な配向の固定に関与しているのではないかと推測した。すなわち、ICT1

挿入領域が付加された RF2 では、終止コドン非依存的なペプチド解離活性が獲得されるのではないかと考えた。

そこで、大腸菌 RF2 に ICT1 挿入領域 ($\alpha 2$) を加えた RF2-ICT1 $\alpha 2$ 変異体を作成した (図 29A)。3.2.1 と同様にして *in vitro* multi-round translation assay によってそのペプチド解離活性を調べたところ、RF2-ICT1 $\alpha 2$ 変異体によるコドン非依存的なペプチド解離活性は見られなかった (図 29B)。この結果から、ICT1 の挿入領域の導入のみでは RF2 のコドン非依存的なペプチド解離活性は獲得されないことが分かった。

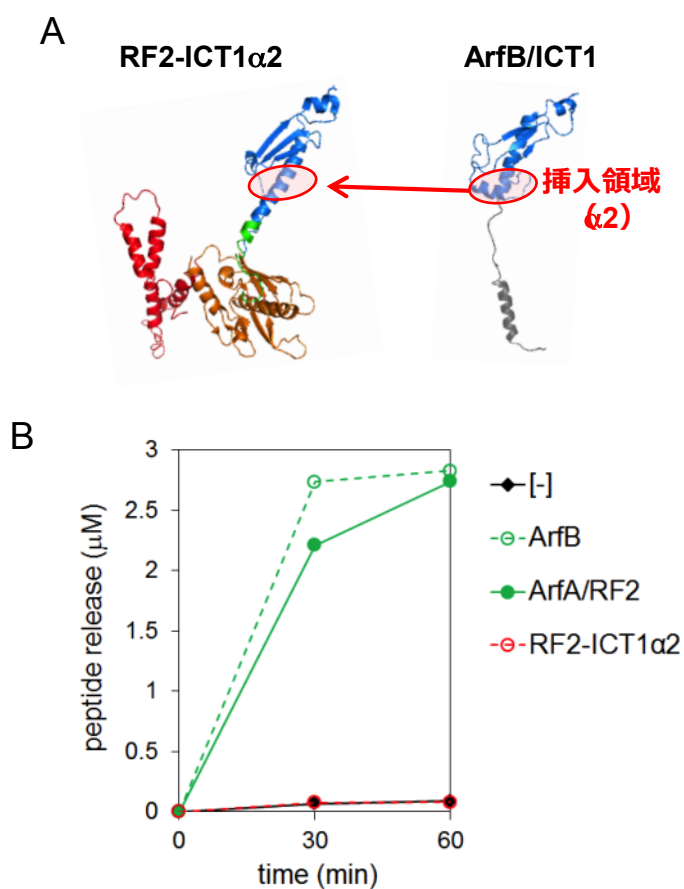


図29 RF2-ICT1 $\alpha 2$ 変異体の機能解析

A : RF2-ICT1 $\alpha 2$ 変異体の概略。各構造は図4および図7と同様である。

B : *in vitro* multi-round translation assayによって RF2-ICT1 $\alpha 2$ 変異体の機能を調べた。nonstop mRNAによる異常停止リボソーム複合体における、ArfB、ArfA/RF2、RF2-ICT1 $\alpha 2$ 変異体のペプチド解離能を解析した。

3.3.5 ICT1 の機能部位解析のまとめ

先行研究において、ICT1/ArfB family の機能部位として、GGQ モチーフがペプチド解離反応に重要であること、C-tail 領域がリボソームとの結合に必須であることが明らかになっている (Handa et al., 2011; Richter et al., 2010)。

これらに加えて本研究では、ICT1/ArfB family に特異的に存在する 25 残基の挿入領域の役割を調べた。*in vitro* 55S peptide release assay や *in vitro* multi-round translation assay、polysome breakdown assay によって、ICT1 の挿入領域における塩基性アミノ酸のアラニン置換はペプチド解離活性を大きく低下させることが示された。一方で Western blotting やクロスリンク反応を用いた解析により、挿入領域の変異はリボソームへの結合自体には影響しないことが示唆された。これらの結果から、ICT1 の挿入領域は、リボソーム大サブユニットにおいて、rRNA との相互作用を通じて GGQ モチーフを適切な配向に固定していることが推測される。

4 考察

4.1 ミトコンドリアにおける ICT1 の作用機序

本研究では、ミトコンドリア 55S リボソームおよび大腸菌 70S リボソームを用いた ICT1 の機能解析を行うことで、ICT1 の詳細な機能について明らかにし、ミトコンドリアにおける ICT1 の役割に関する知見を得た。ミトコンドリアにおいて ICT1 はリボソームタンパク質であると報告されているが、リボソームタンパク質としての ICT1 はペプチド解離反応には関与せず、外来の ICT1 がリボソームに結合することでペプチドの解離を引き起こすことが分かった。

また、ICT1 は、mRNA の 3'末端で異常停止したような、リボソーム A-site に mRNA が存在しないリボソーム複合体において最も高い活性を示した (図 30 左)。しかし mRNA の途中で異常停止したような、A-site およびその下流に mRNA を含むリボソーム複合体 (図 30 中央)、および mRNA を含まないリボソーム複合体 (図 30 右) においてもペプチド解離活性を示した。すなわち ICT1 は様々な状態の異常停止リボソーム複合体において働くことができる多機能なペプチド解離因子であることが示された。以上より、ICT1 の機能について、以下のような作用機序モデルを提唱する。

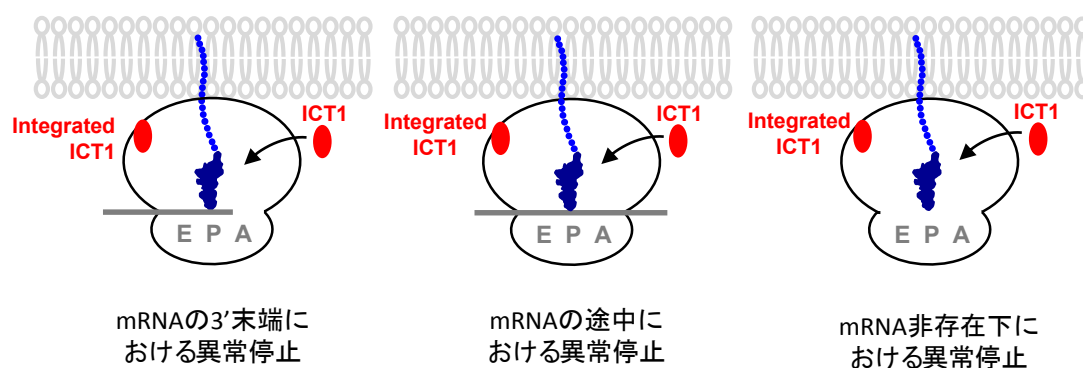


図30 ICT1は様々な異常停止リボソーム複合体において機能する

4.1.1 異常停止解消における ICT1 の機能

4.1.1.1 異常停止解消における ICT1 の作用機序モデル

哺乳類ミトコンドリアにおいて、mtDNA にコードされるタンパク質は全てミトコンドリア内膜の呼吸鎖複合体を構成する膜タンパク質である。ミトコンドリア 55S リボソームは常に内膜上に局在しており、また Oxa1L や Letm1 を始めとした様々な因子がリボソームとミトコンドリア内膜のアンカーとして働く (Ott and Herrman, 2010)。このためミトコンドリアにおけるタンパク質合成は、内膜上において膜挿入過程と連動して起きていると考えられている。従って、ICT1 が機能する翻訳過程の異常停止は、多くの場合が、新生ペプチドが内膜に挿入されている状態と考えられる (図 30)。

ここで、リボソーム上で合成されたタンパク質は、リボソーム大サブユニットのトンネル様構造である polypeptide exit tunnel を通ってリボソームの外界に出る。polypeptide exit tunnel は PTC (peptidyl transferase center) からリボソームの出口まで伸びる新生ペプチドの通り道であり、真核生物 80S リボソームでは、長さ約 100Å であり、新生ペプチドの 30~40 アミノ酸に相当する (Ito and Chiba 2013; Kosolapov and Deutsch, 2009)。約 15 Å の直径は polypeptide exit tunnel 内における構造を制限し、 α ヘリックス以上のかさ高い構造は取れないと考えられている。これまで、polypeptide exit tunnel と新生ペプチドの様々な相互作用が報告されてきた (Ito and Chiba 2013; Wilson and Beckman, 2011)。ミトコンドリア 55S リボソームも同様に、長さ約 88Å の polypeptide exit tunnel を有する (Sharma et al., 2003)。原核生物 70S、真核生物 80S と比較して、polypeptide exit tunnel を構成するリボソームタンパク質や rRNA の組成および構造は大きく異なるものの、polypeptide exit tunnel と新生ペプチドの様々な相互作用が推測されている。

これまでの研究から、ICT1 はリボソームタンパク質としてリボソームに常に存在していると考えられており、本研究でも一致した結果が得られた。ICT1 の存在はリボソーム画分にのみ見られており、リボソーム以外の、マトリックス画分にはその存在は検出されていない (図 13、Richter et al., 2010)。

以上より、ICT1 の異常停止解消における作用機序として、次のようなモデルを提唱する (図 31)。(1) 膜挿入の異常などが原因となって異常停止したリボソームでは、新生ペプチドと exit tunnel 間で通常とは異なる相互作用が形成される。この異常停止特異的な相互作用はリボソームの構造変化を引き起こす。(2) リボソームの構造変化に伴いリボソームタンパク質として存在する ICT1 がリボソームから解離する。(3) リボソームから解離した ICT1 はリボソーム A-site に結合し、ペプチド解離反応を引き起こす。その後のリボソーム再生過程において、ICT1 を含むリボソームが再形成され、新たなタンパク質合成のサイクルが開始される。また、ICT1 によって解離されたペプチドは、内膜と外膜の間の膜間領域に放出され、膜間領域に存在するプロテアーゼによって分解に導かれると推測される (Arnold and Langer, 2002)。

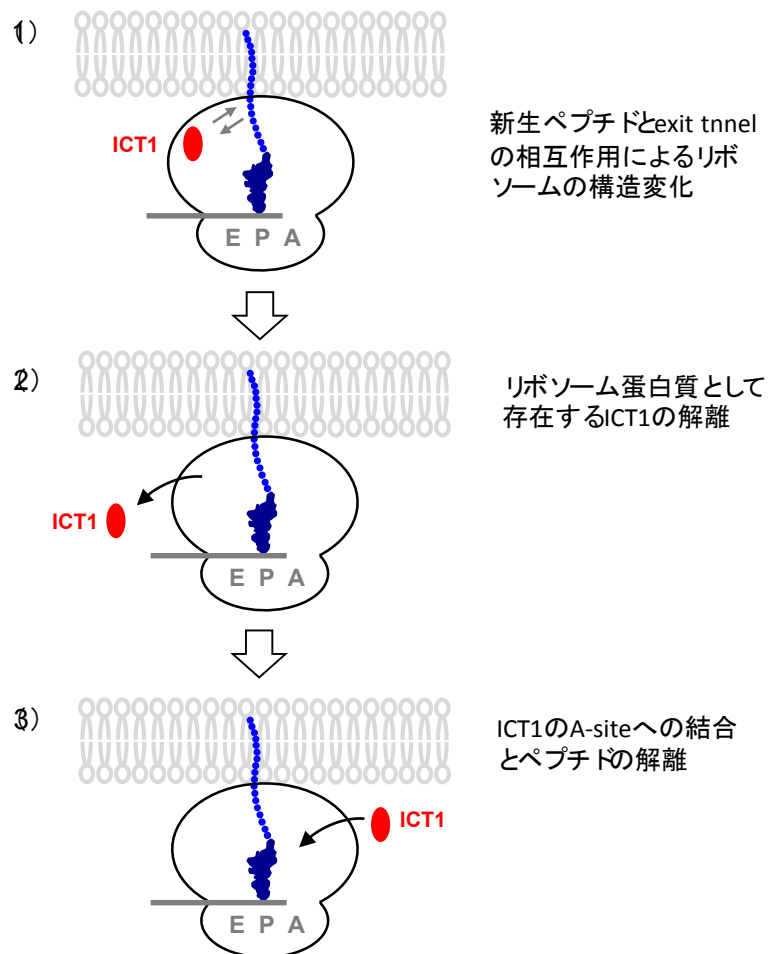


図31 翻訳の異常停止におけるICT1の作用機序モデル

- (1) 異常停止したリボソームにおいて、新生ペプチドとexit tunnelの相互作用はリボソームの構造変化を引き起こす。
- (2) リボソームの構造変化に伴いリボソームタンパク質として存在するICT1がリボソームから解離する。
- (3) リボソームから解離したICT1はリボソームA-siteに結合し、ペプチド解離反応を引き起こす。

ICT1のリボソームからの解離シグナルについては、上記に述べた新生ペプチドと exit tunnel 間の相互作用によるリボソームの構造変化に加えて、様々な可能性が考えられる。合成途中のタンパク質の生合成異常や膜挿入の異常が、生合成因子やシャペロンなどを通じて ICT1 に伝わるのかもしれない。または、ミトコンドリアの機能異常はミトコンドリアマトリックス内の pH 低下を引き起こすが、この pH 低下が ICT1 の解離シグナルとなるのかもしれない。しかしこの可能性について検証したところ、今回の実験からは pH 依存的な ICT1 の解離は検出できなかった (図 14)。

細胞における ICT1 の欠損はリボソームの生合成異常につながる (Richter et al., 2010)。このため、ICT1 がリボソームから解離した場合、リボソームの機能が保たれるか否かは疑問である。しかし、ICT1 が解離したリボソームはペプチドの解離反応に関与する PTC や A-site の構造が極限の状態を保たれることで、1 アミノ酸分のペプチド転位反応ならば可能であり、ペプチドの解離反応は生じ得るのかもしれない。ペプチドの解離後、次の翻訳反応の開始までに ICT1 が組み込まれたリボソームが再形成されるか、または、ICT1 が解離したリボソームはそのまま分解に導かれるのかもしれない。

本研究ではミトコンドリア 55S リボソームにおいて、 $ac[{}^3H]Phe-tRNA^{Phe}$ の加水分解を解析した。この実験では 1 アミノ酸の解離のみを解析しているため、上述した仮説のような新生ペプチドとリボソームの相互作用は形成されず、内在性 ICT1 がリボソームから解離するための条件としては十分ではないと推測される。上記仮説の検証のためには、今後、新生ペプチドの膜挿入と連動した異常停止の再現が重要であると考えられる。現在、哺乳類ミトコンドリア内タンパク質合成系の再構築を行っており、既に mtDNA コードタンパク質のいくつかについてはその合成に成功している。この系を用いて、プロテオリボソーム存在下におけるタンパク質合成を行うことで、膜挿入と連動した異常停止リボソームを形成させ、ICT1 の解離される条件について解析を行いたい。

また生体内では、翻訳開始段階における異常停止リボソーム複合体、すなわちペプチド転位反応を引き起こすことができない $fMet-tRNA^{fMet}$ または短いペプチドを持つリボソーム複合体も存在し得ると推測される。このような場合にはペプチドが十分な長さを持たないために、ICT1 の解離を引き起こす新生ペプチドとリボソームの相互作用が生じるかは疑問である。異常停止特有の PTC (peptidyl transferase center) の構造が ICT1 の解離シグナルとなる可能性も考えられる。新生ペプチドとリボソームの相互作用や PTC の構造変化など、ICT1 の解離シグナルには様々な可能性が推測される。本研究ではそのような ICT1 の解離を引き起こす異常停止は再現されず、今後の研究が期待される。

現在のところミトコンドリアの可溶性画分には ICT1 の存在が検出されていないことから、ICT1 がリボソームから解離される機構が推測される。しかし、リボソームとは別に、ICT1 は内膜上に局在している可能性も考えられる。この場合、ミトコンドリアの分画において、55S リボソームと内膜の完全な分離は不可能であるため、これまでのような、リボソーム画分のみへの局在が見られるはずである。従って、リボソームタンパク質の ICT1 とは別に、このような遊離 ICT1 が、リボソーム A-site に結合することでペプチドの解離を引き起こす可能性も十分に考えられる。

4.1.1.2 39S 大サブユニットの CryoEM 構造における ICT1 の結合部位

最近になって、ミトコンドリア 55S リボソームの 39S 大サブユニットに関して、4.9Å 解

像度の Cryo-EM 構造が報告された (Greber et al., 2014)。過去の 55S リボソームの CryoEM 構造では、リボソーム大サブユニットの central protuberance (CP) に存在するリボソームタンパク質の大半が同定されていなかった (Sharma et al., 2003)。しかし Greber らの報告によって、central protuberance (CP) に存在するミトコンドリア特有のリボソームタンパク質が同定され、同時に ICT1 が同定された (図 32)。リボソーム大サブユニットの特徴的な構造として、L1 stalk、L7/L12 stalk に加えて、CP が存在し、突起状の構造を形成する。原核生物 70S およびミトコンドリア 55S とともに保存された構造であるが、ミトコンドリア 55S リボソームではタンパク質成分の増加に伴い大きさが約 2 倍となっている。この報告によって、55S リボソームの CP には、大腸菌オーソログを持つ MRPL18、MRPL15 に加えて、55S リボソーム特有の MRPL38、MRPL49、ICT1 が存在することが分かった。さらに、ICT1 のペプチド解離因子としての機能について、リボソームタンパク質の ICT1 は、その結合部位 CP からはペプチド解離反応への関与は不可能であると推測された。未だに検出されていない遊離 ICT1 がペプチド解離に関与するか、または、ペプチジル tRNA や ICT1 自身の大幅な構造変化によってペプチドの解離が生じると推測された。この報告は、本研究による結果と一致したものとなっている。

上記の報告 (Greber et al., 2014) では、構造解析とともに、リボソームタンパク質のクロスリンク解析が行われた。その結果、ICT1 は CP (central protuberance) に存在するリボソームタンパク質、MRPL15、MRPL18、MRPL49 と、Lys 残基同士のクロスリンク産物が検出された。この報告で使用されたクロスリンカーは DSS (disuccinimidyl suberate) であり、本研究で使用したクロスリンカー BS³ の不溶性アナログであり、スパーサー鎖長は両者で同じである。従って本研究で得られたクロスリンク産物は、Greber らによって報告されたクロスリンク産物と同様であると考えられる。図 28 の single asterisk で示したバンドは、その分子量などから MRPL15 (mature protein M.W. 33kDa) とのクロスリンク産物であり、MRPL15 K249 と ICT1 K66 間のクロスリンクであると推測される。しかし、本研究においてクロスリンクされたリボソームタンパク質の同定には、今後、質量分析法を用いた詳細な解析が必要である。

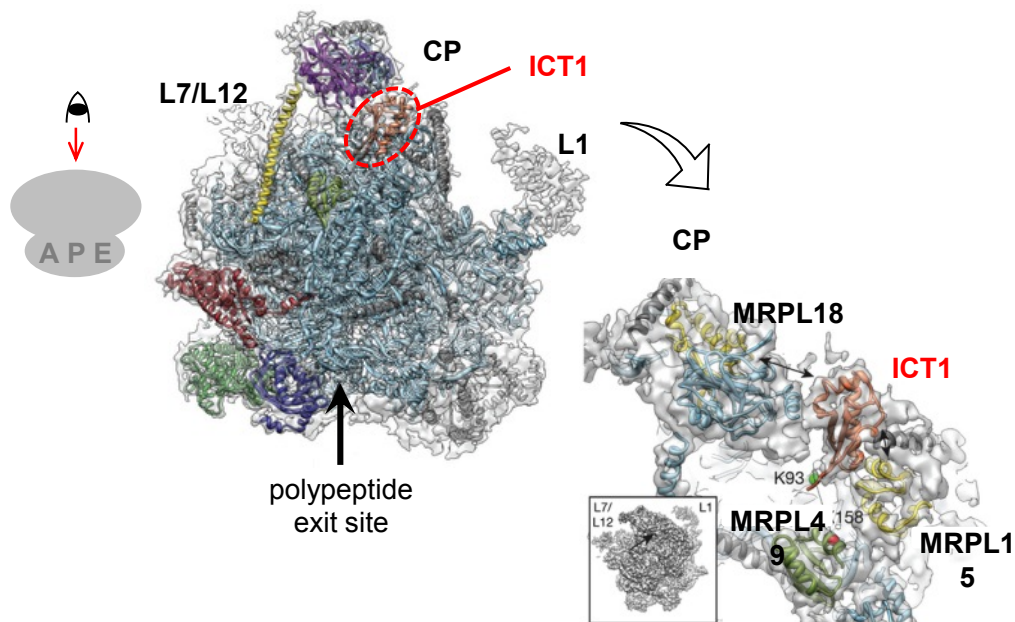


図32 ミトコンドリア39S大サブユニットのCryoEM構造
ICT1はcentral protuberanceに存在する (Greber et al., 2013)。

4.1.1.3 mRNA 非存在下の異常停止

リボソーム上に mRNA が存在しない異常停止リボソーム複合体では、acPhe-tRNA は不安定に結合し、PTC (peptidyl transferase center) に安定に配向しない。アミノアシル tRNA アナログとして働く抗生物質である puromycin では、このようなアミノアシル tRNA も基質とすることができペプチドの解離を引き起こす。本研究では、ICT1 についても puromycin と同様の効果が見られた。一瞬でもペプチジル tRNA がリボソーム上で適切な配向を取れば、ICT1 はペプチド解離反応を引き起こす。このような mRNA 非存在下における ICT1 の特徴は、以下のような理由から、膜挿入途中の異常停止に適応した機能であると考えられる。

膜挿入と連動した異常停止においては、ペプチジル tRNA およびリボソームは内膜に固定されている。一方で、タンパク質合成反応が停止している状態の mRNA はリボソーム上を進行していないことで、ヌクレアーゼによって切断されやすくなっており、切断された mRNA は自然にリボソームから解離する。この結果 mRNA 非存在下の異常停止したリボソーム複合体が形成される (図 33)。すなわち、mRNA 非存在下のペプチジル tRNA/リボソーム複合体は、膜挿入途中の異常停止において特に形成されやすいと推測される

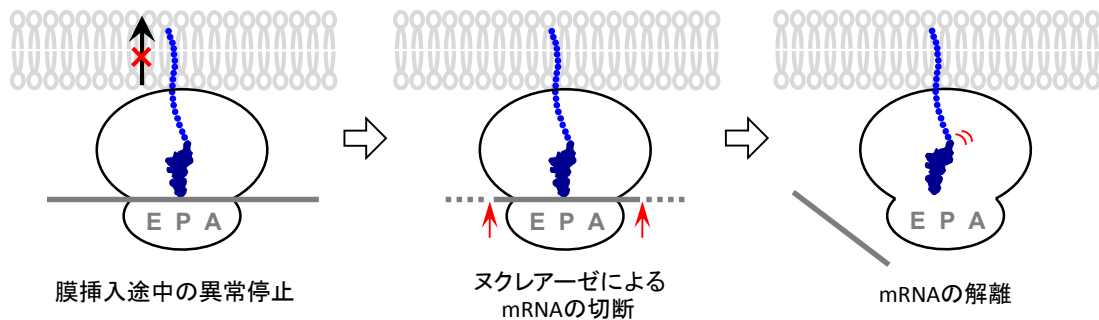


図33 mRNA非存在下の異常停止リボソーム複合体の形成

膜挿入と連動した異常停止においては、ペプチジルtRNAおよびリボソームは内膜に固定されている。タンパク質合成反応が停止している状態のmRNAはリボソーム上を進行していないことで、ヌクレアーゼによって切断され、短いmRNAは自然にリボソームから解離する。

4.1.2 翻訳終結における機能

哺乳類のミトコンドリアゲノム(mtDNA)にコードされている13個のタンパク質のうち、cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) および NADH dehydrogenase 6 (ND6) は ORF (open reading frame) の3'末端が AGA および AGG となっている。哺乳類ミトコンドリアでは、AGA、および AGG に対応する tRNA は存在しないため、AGA/G コドンはミトコンドリア特有の終止コドンと考えられている。しかし翻訳終結因子として知られる RF1Lmt は UAA、および UAG コドンのみを認識し、AGA、AGG コドンは認識しない。従って、CO1/ND6 mRNA の終結機構は、未だに明らかになっていない。

一方で、RF1Lmt が CO1 と ND6 の翻訳終結を担うとの推測もされている (Temperly et al, 2010)。哺乳類ミトコンドリアでは、CO1 と ND6 mRNA の終止コドン AGA/G の-1 部位には U が保存されている。また、AGA/G の両側はフレームシフトを引き起こしやすい配列となっている。このため、CO1/ND6 mRNA では-1 フレームシフトにより UAG 終止コドンが生じ、これによって RF1Lmt による終結につながると考えられている。しかし、この仮説に関しては多くの点で疑問が残る。AGA/G の上流の保存された U は哺乳類に限定されており、多くの生物種では U ではなく A が存在する (Lind et al., 2013)。哺乳類ミトコンドリアにだけ、特有の翻訳終結機構が存在するとは考えにくい。さらには、フレームシフトが起きた場合、P-site のペプチジル tRNA は通常の P/P state ではないと考えられる。終結因子 RF1Lmt はこのような安定した P/Pstate をとらないペプチジル tRNA を基質とすることができないと推測される。従って、CO1 および ND6 の翻訳終結を RF1Lmt が担うかどうかは未だ不明であり、その終結機構は明らかではない。

本研究では、ICT1は mRNA の途中における異常停止において、コドン非依存的に機能できることが示された。この結果から、ICT1は、CO1/ND6 mRNA の翻訳において、対応する tRNA や終結因子が存在しないために AGA/G コドンで異常停止したリボソーム複合体においても機能できると考えられる。すなわち ICT1は、異常停止解消因子として働くとともに、CO1/ND6 mRNA の翻訳終結因子としての役割も担うと推測する (図 34)。

近年、ICT1 と ArfB の C-tail 領域のリボソーム結合部位について、構造モデルが報告された (Lind et al., 2013)。この報告では、ICT1 と ArfB では C-tail 領域のリボソーム結合部位がわずかに異なることが報告された。ICT1 C-tail 領域は mRNA entry channel を占有せず、ICT1 C-tail 領域はリボソーム A-site の mRNA と共存することができ、A-site mRNA 存在下においても ICT1 は A-site に結合し機能できることが示唆された。この報告は、本研究結果と一致する。

ICT1は、CO1/ND6のミトコンドリア内膜における生合成を感知することでリボソームから解離し、翻訳終結を引き起こすのかもしれない (図 30)。CO1/ND6 の生合成の感知は、リボソームあるいは生合成因子を介したものが推測される。実際そのような機能が、酵母ミトコンドリアにおいて報告されている (図 35; Ott and Herrmann, 2010; Perez-Martinez et al., 2009)。酵母ミトコンドリアに存在する Mss51 は COX1 mRNA の翻訳促進とその生合成の両方に関与する。COX1 mRNA の 5'UTR との相互作用を通じてリボソーム上でその翻訳を促進し、続いて内膜上で COX1 の生合成の促進を行う。Mss51 の生合成への関与は翻訳促進のための Mss51 の不足につながり、更なる COX1 の翻訳が制限される。しかし、生合成の完了によって Mss51 は COX1 から解離し、新たな COX1 mRNA の翻訳促進に加わる。

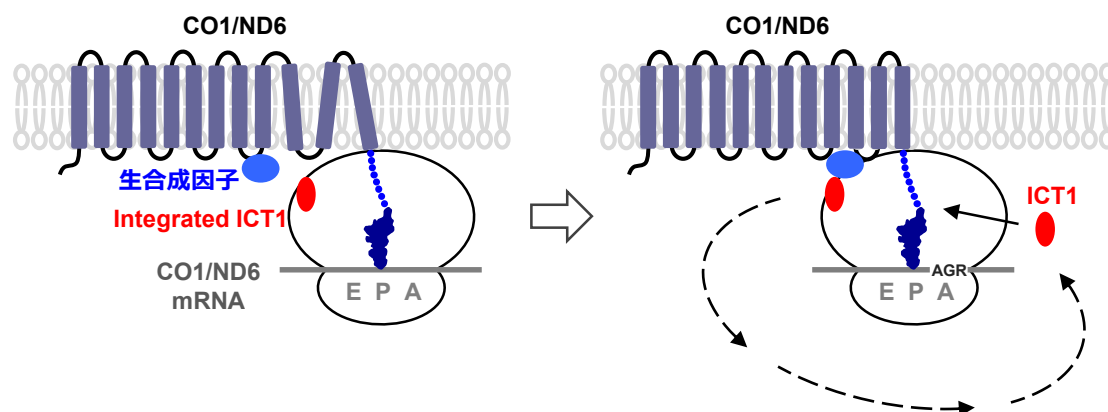


図34 CO1/ND6 mRNAの翻訳終結におけるICT1の作用機序モデル
ICT1は内膜中におけるCO1/ND6の生合成を感知してリボソームから解離し、リボソームA-siteに結合することでペプチドの解離を行う。

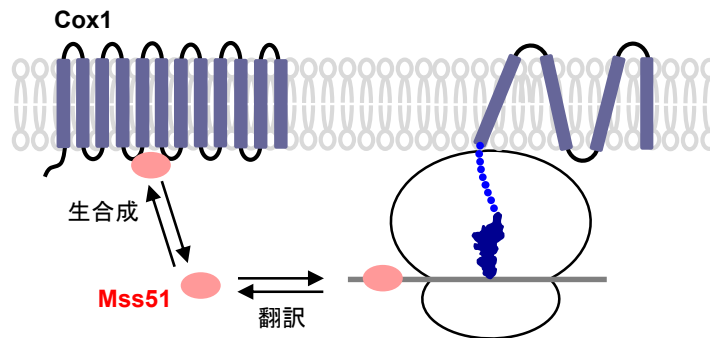


図35 Cox1合成におけるMss51の機能

酵母ミトコンドリアにおいて、Mss51はCox1の生合成と翻訳開始の促進に関与する。Mss51はCox1の内膜における生合成の間は内膜上に局在する。生合成の完了に伴い内膜上から解離し、Cox1 mRNAの5'UTRに結合することで、新たなCox1の合成のための翻訳開始反応に関与する (Ott and Herrmann, 2010)。

また、mtDNAにコードされたタンパク質の約半分はそのORF (open reading frame) に終止コドンを持たず、これらは、ミトコンドリアに存在する mt poly(A) polymerase (mtPAP) によって3'末端にpoly(A)が付加されることで、終止コドンUAAがつけられる (Nagaike et al., 2005)。しかし、何らかの異常により poly(A)付加が正常に行われなかった場合、多くの mRNA には終止コドンを持たないことになる。ICT1 はこのような mRNA の翻訳終結にも関与する可能性がある。

4.2 リボソームタンパク質としての ICT1 の生理的意義

ICT1 と ArfB の相違点として、真核生物の ICT1 はミトコンドリアにおいて、リボソーム構成因子として常にリボソームに存在する。一方で、原核生物の ArfB はリボソームタンパク質ではない。

この両者の生理的役割の違いとして、ICT1 にのみ存在する N 末側領域の関与が考えられる (図 36)。最近報告されたミトコンドリアリボソーム 39S 大サブユニットの CryoEM 構造では、ICT1 の N 末側の結合部位は明らかにはなっておらず (Greber et al., 2014)、ICT1 特異的 N 末領域のリボソームタンパク質としての機能における重要性については、今後更なる解析が必要である。本研究では豚肝臓ミトコンドリアから調製したリボソームは全て、ICT1 を含んでいた。また、高塩濃度による処理など、55S リボソームに対して ICT1 を解離させるための様々な処理を施したが、ICT1 のリボソームからの解離は見られなかった。細胞において N 末欠損 ICT1 の発現により、ICT1 欠損 55S リボソームが形成されるかどうか検証

するのもよい。しかし、ICT1 の欠損はリボソームの生合成異常につながり (Richter et al., 2010)、ICT1 を含まないリボソームは正常な生合成を完了できないと推測される。ArfB に対する ICT1 特異的 N 末領域の付加が、ArfB を含む 55S リボソームの形成につながるか検証するのも良いだろう。

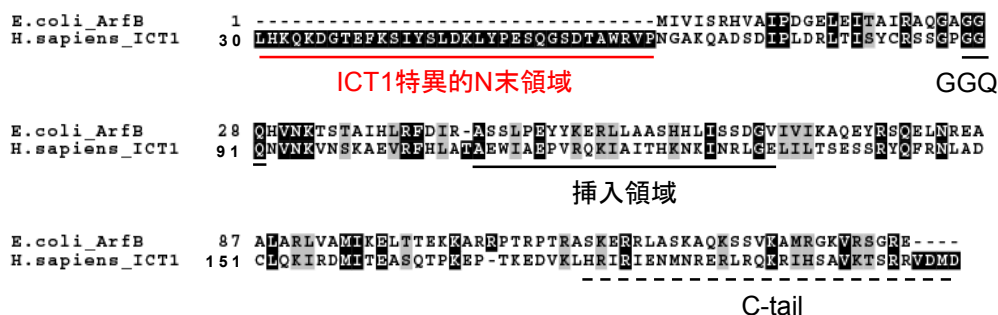


図36 ICT1とArfBのアミノ酸配列比較

ICT1のアミノ酸配列はミトコンドリア移行シグナル (1-29) を除いた配列が示されている。

翻訳因子の N 末端側のリボソーム結合能への関与は既に他のミトコンドリア翻訳因子において示されている。ミトコンドリアリボソーム再生因子 RRFmt では、大腸菌 RRF と比較して余分な N 末領域が存在し、この領域の存在によって RRFmt ではリボソームとの結合能が高くなっている。

また、ミトコンドリアにおいて、膜タンパク質に特化したタンパク質合成をより効率化するために、ICT1 はリボソームタンパク質として存在しているのかもしれない。4-1 項で述べたような、異常停止によるリボソームの構造変化や CO1/ND6 の生合成を効率よく感知するために、常にリボソームに存在していると推測される。

本研究では、55S リボソームと ICT1 を混合すると、ICT1 が分解される傾向が見られた (図 11、図 26、図 28)。ICT1 はミトコンドリアにおいて、プロテアーゼによる基質となりやすく、非常に分解され易い性質を持つのかもしれない。一方で、ICT1 と大腸菌 70S リボソームとの混合では、そのような ICT1 の分解は検出されなかった。さらに、ICT1/ArfB は大腸菌において安定に発現し、分解産物は見られない。また、ArfB はリボソームタンパク質ではなく、通常はリボソームには組み込まれていない。これらを踏まえると、ミトコンドリアという特別な環境においては、ICT1/ArfB は分解されやすい性質のタンパク質であり、このため、通常はリボソームに含まれることで分解から守られて存在し、必要な時にのみリボソームから解離するのかもしれない。それに対し、原核生物では ICT1/ArfB は安定に存在できるため、遊離タンパク質として存在するのだろう。上記仮説について検証するために、ミトコンドリア抽出液依存的に ArfB の分解産物が検出されるか解析するのも有用であると

考えられる。

4.3 ICT1 が基質とする異常停止の特徴について

4.3.1 *in vitro* multi-round translation assay

4.3.1.1 *in vitro* multi-round translation assay における ICT1 の機能解析

大腸菌 70S リボソームを用いた *in vitro* multi-round translation assay では、ICT1 はリボソーム A-site に mRNA が存在しない時に最も高い活性を示したが、リボソーム A-site に mRNA が存在する場合にも優位なペプチド解離活性を持つことが分かった。

この実験では、ICT1 は RF1Lmt (終濃度 0.2 μM) の約 5 倍の濃度 (終濃度 1.0 μM) の時、A-site 終止コドン存在下において RF1Lmt と同等のペプチド解離活性が検出された。このため、ICT1 に関する解析は全て RF1Lmt の 5 倍量で行った。言い換えると、A-site に終止コドンが存在する場合には、当量の条件下では、ICT1 より RF1Lmt の方がペプチド解離活性が高いという結果となった。しかし今回の実験結果から、A-site に mRNA が存在する条件下において ICT1 は優位なペプチド解離活性を持つと考えた。*in vitro* multi-round translation assay では、mRNA 非存在下のペプチドが合成されていない場合と、mRNA は存在するがペプチドの解離が生じていない single-round のペプチド合成の場合とでは、その差が再現性よく検出できる。さらに、single-round のペプチド合成と multi-round のペプチド合成は明らかな差が見られる。今回の結果から、ICT1 1.0 μM の条件で明らかな multi-round のペプチド合成が検出された。また、同濃度 1.0 μM の RF1mt の場合にはこのような multi-round の合成は見られなかった。従って、今回見られた ICT1 の活性は RF1Lmt の 5 倍量の濃度ではあるが、優位なものであると考えられる。

4.3.1.2 連続したプロリン配列による異常停止に対する ICT1 の機能解析

本研究では、*in vitro* multi-round translation assay によって、連続したプロリンによる翻訳の停止において ICT1 が機能できるか検証した。その結果、連続したプロリンによる翻訳停止において、ICT1 のペプチド解離活性は検出することができなかった。一方で、大腸菌 EF-P は、連続したプロリンによる翻訳停止の解消効果を持つことが知られているが (Doerfel et al, 2013; Ude et al., 2013)、*in vitro* multi-round translation assay では、連続したプロリン配列にお

ける EF-P の翻訳促進効果についても検出されなかった。

通常、生体内で生じる連続したプロリンによるペプチド転位反応速度の低下は EF-P によって解消されるはずである。しかし、*in vitro* multi-round translation assay では EF-P の効果が見られなかったことから、今回の実験条件で作りに出されたプロリンによる翻訳停止は EF-P が働くことができない、特別な状況が作り出されていると推測される。従って ICT1 の結果も今回の実験におけるアーティファクトな要因によって生じていると考えられる。現在のところ、合成するペプチドの配列によって ICT1 の反応速度がどのように影響するのかは明らかではなく、今後さらなる研究が期待される。ICT1 の機能がアミノ酸配列に依存するか否かは定かではないが、ICT1 が特異的に機能するアミノ酸配列が同定されることで、ICT1 が対象とする異常停止の特徴についてさらなる知見が得られるだろう。

今回の実験において、プロリンの連続配列が通常とは異なる特別な状態となっている原因の 1 つとして、 Mg^{2+} などの塩濃度の影響が考えられる。*In vitro* multi-round translation assay は、無細胞タンパク質合成系において至適化された塩濃度 ($13 \text{ mM } Mg^{2+}$) の下で翻訳反応を行っているが、塩濃度のわずかな違いで通常取りうる Pro-tRNA よりもより硬い構造をとっている可能性も否定できない。このため、EF-P によるペプチド転位反応の促進や、ICT1 によるペプチド解離反応が生じなくなったと推測される。

4.3.2 70S リボソームにおける ICT1 の結合部位の解析

本研究では、70S リボソームにおける ICT1 の結合部位の解析として、EF-G1mt および RRFmt を用いて ICT1 との結合競合性を解析した。その結果、EF-G1mt および RRFmt の結合によりリボソームにおける ICT1 の結合が阻害されたために、ICT1 と EF-G1mt、RRFmt は同一の結合部位を持つと推測した。EF-G1mt、RRFmt は、その原核生物オーソログの構造解析から、どちらもリボソーム A-site 近傍に結合すると推測される (Agrawal et al., 2004; Gao et al., 2009; Tourigny et al., 2013)。また、70S リボソームにおける ArfB の結晶構造 (Gagnon et al., 2012) から、ArfB もリボソーム A-site 近傍に結合する。しかし、ArfB と EF-G および RRF の 70S リボソームにおける結合部位は完全には一致しないため、これらの因子が同一リボソームにおいて共存する可能性も十分に考えられる。従って、今回見られた ICT1 と EF-G1mt、RRFmt との競合性は、EF-G1mt と RRFmt がリボソームに結合したことでリボソームの構造変化が生じ、それによって ICT1 がリボソームに結合できなくなったことが原因であるかもしれない。今回、EF-G1mt と RRFmt のみを用いて、結合競合性について解析を行ったが、今後、アミノアシル tRNA/EF-Tu など他の A-site 結合因子や、その他様々な因子との結合競合性についても解析を行うべきである。また、55S リボソーム上での外来 ICT1 の結合部析解析として、55S リボソームにおける外来 ICT1 と A-site 結合因子の競合性についても解析が必要である。さらには、ICT1 の正確な結合部位に関する生化学的解析として、

ICT1 に対して部位特異的なケミカルプローブを導入することでリボソームとの相互作用部位を同定する解析などが有用である (He et al., 2010)。

一方で、直接の実験結果はないものの、先行研究による ArfB のリボソーム結合部位から (Gagnon et al., 2012)、外来 ICT1 のリボソーム結合部位は ArfB と同様にリボソーム A-site 近傍であることは明らかであると考えられる。

4.3.3 膜挿入途中の異常停止における ICT1 の機能

本研究では、プロテオリボソームの存在下で *in vitro* タンパク質合成を行うことで、膜挿入と連動した異常停止における ICT1 の機能を解析した。膜挿入途中の異常停止リボソーム複合体は、新生ペプチドに膜挿入の力が加わっており、膜挿入と連動していない異常停止リボソーム複合体と比較して、新生ペプチドや PTC (peptidyl transferase center) の構造が異なると推測される。今回の結果から、ICT1、ArfB とともに、膜挿入途中の異常停止においても機能できることが分かった。*in vitro* 55S/70S peptide release assay において、ICT1/ArfB は mRNA 非存在下におけるリボソーム上でもペプチドの解離活性を持ち、PTC において安定した配向をとらないペプチジル tRNA に対しても機能できることが示唆された (図 10)。新生ペプチドに膜挿入の力が加わった異常停止リボソーム複合体において働くことができる ICT1 の機能は、mRNA 非存在下の安定した配向をとらないペプチジル tRNA に対しても働くことができる ICT1 の機能ともよく一致していると考えられる。

mtDNA にコードされるタンパク質は全て膜タンパク質であることから、ICT1/ArfB family は tmRNA や ArfA と比較して、膜挿入途中の異常停止に特化した因子ではないかと推測した。しかし今回の結果からは、ICT1 や ArfB と ArfA・RF2 の機能の違いは見られず、ともに膜挿入途中の異常停止リボソーム複合体においてペプチド解離活性を示した。大腸菌において ICT1/ArfB family と ArfA や tmRNA は同様の基質特異性を持ち、細胞内における発現量の違いによって、異常停止解消における役割が分担されている可能性も十分に考えられる。一方で、各因子が基質とする異常停止リボソーム複合体には違いがあり、細胞内においてそれぞれが適切に役割分担されている可能性も考えられる。今回行った実験では、膜挿入と連動した異常停止に特異的な条件を作り出すには不十分であったのかもしれない。今後、*in vivo* 手法を用いた解析や、より生体内に近い環境下でのペプチド解離活性の解析などを行うことで、新たな知見が得られるだろう。

4.4 ICT1/ArfB の挿入領域の役割

本研究では、ICT1/ArfB に特徴的な N-globular 領域に存在する 25 残基の挿入領域の機能

を調べた。その結果、挿入領域における塩基性アミノ酸の変異によって、ICT1 のペプチド解離活性は消失するが、リボソームとの結合に大きな変化は引き起こさないことが分かった。

4.4.1 ICT1 挿入領域のリボソームとの相互作用部位

70S リボソーム結合 ArfB の結晶構造によると、ArfB の挿入領域は 70S リボソーム大サブユニットの 23S rRNA と相互作用をする (図 37)。23S rRNA の U1946 および C1947 のリン酸基主鎖が ArfB の His62 の主鎖 N および Ser60 の O γ とそれぞれ水素結合を形成する。また挿入領域近傍には相互作用できるリボソームタンパク質は存在しない。ICT1 と ArfB で挿入領域のアミノ酸配列の保存性は低く、これら 2 つの残基は ICT1 には保存されていない。ICT1 の 25 残基挿入領域では、 α ヘリックス構造に加えて、Lys124-Asn125-Lys126 の 3 残基による 3_{10} ヘリックス構造が形成される (Kogure et al., 2013)。ペプチド解離活性が消失する 3 残基同時置換変異体 ICT1 [$\alpha 2$] (124-126-129A) は、 3_{10} ヘリックス構造を中心とした領域に変異が導入されており、 3_{10} ヘリックス領域の重要性が示唆される。またこの領域は、上述した、ArfB 挿入領域と rRNA 間で水素結合が形成される部位 (ArfB His62) にあたる。 3_{10} ヘリックス構造は ArfB には存在しないことから、この領域は、ICT1 においてミトコンドリア 55S リボソームに対応して変化したと考えられる。ArfB と同様の水素結合が、ミトコンドリアリボソーム大サブユニット 16S rRNA と ICT1 挿入領域の 3_{10} ヘリックス構造近傍において形成されると推測される。

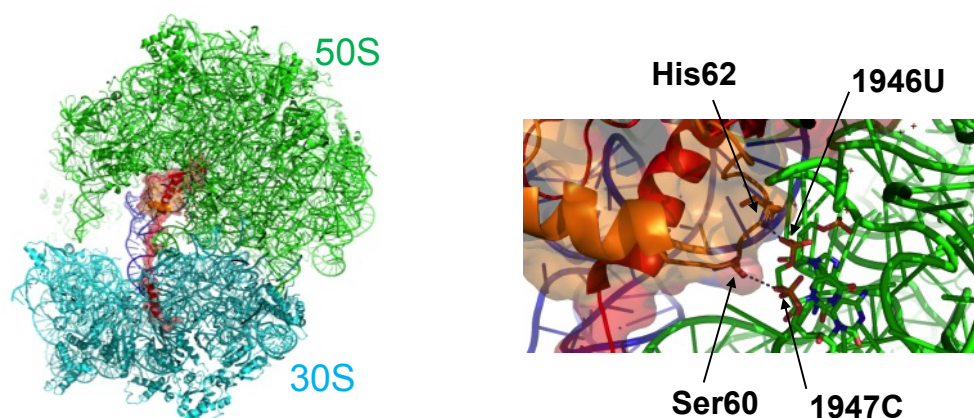


図37 ArfB挿入領域と70Sリボソームの相互作用
ArfB挿入領域は50S大サブユニットにおいて、23S rRNA
と水素結合を形成する (Gagnon, et al., 2012)。

また挿入領域変異体を用いた解析では、ミトコンドリア 55S リボソームを用いた解析 (*in vitro* 55S peptide release assay) と比較して、大腸菌 70S リボソームを用いた解析 (*in vitro* 70S peptide release assay, *in vitro* multi-round translation assay, polysome breakdown assay) において、挿入領域における変異の影響がより大きく見られた。ICT1 の挿入領域は大腸菌 70S リボソームにおいてより重要な相互作用を形成するのかもしれない。

挿入領域における変異は、rRNA との相互作用の消失につながり、GGQ モチーフが適切に配向されなくなったと考えられる。一方で ICT1 のリボソームへの結合自体は C-tail 領域が重要である (Handa et al., 2010)。本研究による解析では、挿入領域変異体と ICT1 [WT] のリボソームへの結合能は同様であったが、この理由として、挿入領域変異体においても、C-tail 領域とリボソームとの相互作用は保持されるためにリボソームに結合できたと推測される。

終結因子においては終止コドン認識による一連の構造変化が GGQ モチーフの配向を制御しており、ドメイン 3 とドメイン 4 の間に存在する switch loop が重要な役割を果たす。ICT1 は、コドン認識領域および switch loop を欠いており、これらに代わる GGQ モチーフの制御領域として、挿入領域が存在するのだろう。

最近になって、大腸菌オーソログ ArfB について、挿入領域の 1 残基置換の変異によるペプチド解離活性の低下が報告され、本研究と一致している (Kogure et al., 2013)。大腸菌 ArfB とミトコンドリア ICT1 の挿入領域は、そのアミノ酸配列の保存性の低さにも関わらず、それぞれ対応するリボソーム上で同様の役割を担うと推測される。

4.4.2 挿入領域の ArfA としての機能

本研究では、ICT1/ArfB に特異的に存在する 25 残基挿入領域が、大腸菌 RF2 に対する ArfA と同様の役割を担う可能性について検証した。RF2-ICT1 α 2 変異体を用いてコドン非依存的なペプチド解離活性を解析したところ、ICT1 の挿入領域の導入のみでは大腸菌 RF2 のコドン非依存的なペプチド解離活性は獲得されないことが分かった。

これまで ArfA の機能については、tRNA が ArfA のリボソームへの結合を促進するという報告や、ArfA はリボソーム E-site に結合するとの推測がされている (Chadani et al., 2012; Pech and Nierhaus 2012)。さらに、ArfA は、RF2 の終止コドン非存在下のリボソームへの結合を安定化すると考えられ、このため、ArfA の decoding center 近傍への結合も推測される。これに対し、ICT1 挿入領域はリボソーム大サブユニットに結合する。これらを踏まえると、ArfA と ICT1 挿入領域はリボソームへの結合部位が異なり、それぞれのペプチド解離因子における役割は異なっていると考えられる。

しかし RF2-ICT1 α 2 変異体の作成では、25 残基の挿入領域の導入に加えて、挿入領域の N-、C-末側約 10 アミノ酸を ICT1 の対応するアミノ酸に置換した。挿入領域とともに置換

した部位に、RF2/ArfA として機能するための重要な領域があった可能性も排除できない。さらには、RF2/ArfA は原核生物にのみ存在する機構であることから、ICT1 ではなく ArfB の挿入領域の導入が必要であったのかもしれない。実際、ICT1 と ArfB の挿入領域のアミノ酸配列保存性は低くなっている (Kogure et al., 2013)。

4.4.3 挿入領域変異体のクロスリンク反応によるリボソームとの相互作用解析

クロスリンク解析において、ICT1 [WT]と挿入領域変異体 ICT1 [$\alpha 2$]で、クロスリンク産物のバンド強度に違いが見られ、ICT1 [$\alpha 2$]ではクロスリンクの形成効率がいくらか低下した (図 28)。C-tail 領域の存在により両者は同様に小サブユニット上には固定されているものの、挿入領域の変異によって、N-globular 領域の大サブユニットへの結合が弱まったと推測される。本研究では ICT1 の変異体として ICT1 [$\alpha 2$]のみを用いた。今後、挿入領域の他の部位における変異体や、ICT1 [GSQ]、ICT1 [ΔC]を用いたクロスリンク解析を行うことで、より多くの知見が得られるだろう。挿入領域変異体、ICT1 [R116A]、ICT1 [K118A]、ICT1 [K124A]、ICT1 [K126A]、ICT1 [R129A]においてそれぞれペプチド解離活性に差が見られていたことから (図 24)、変異体間におけるクロスリンク反応の差異を比較することで、挿入領域のより詳しい理解につながると考えられる。

4.5 RF1mt の機能

哺乳類ミトコンドリアに存在する 4 つのペプチド解離因子 (RF1Lmt、RF1mt、ICT1、C12orf65) のうち、終結因子 RF1Lmt と ICT1 についてのみ、リボソーム依存的な GGQ モチーフを介したペプチド解離活性が検出されている (Duarte et al., 2012)。RF1mt および C12orf65 については、そのペプチド解離活性は未だに検出されておらず、その役割は明らかになっていない (Antonicka et al., 2010; Nozaki et al., 2008)。本研究では ICT1 のペプチド解離能の解析と同時に、RF1mt のペプチド解離能についても解析を行った。

RF1mt は RF1Lmt と相同性が高く、特に domain 2、3、4 間でよく保存されている。一方で、両者の終止コドン認識領域において配列の違いが見られる (Young et al., 2010)。また、大腸菌終結因子 RF1、RF2 と比較すると、RF1mt、RF1Lmt とも RF2 より RF1 と相同性が高い。RF1mt は、ICT1 と同様、ミトコンドリア翻訳系に必須のタンパク質であり、これまで、RF1mt について様々な研究が行われてきた。AGA、AGG を終止コドンとして認識する終結因子であることや、リボソーム A-site に mRNA が存在しないときに機能する異常停止解消因子であることなどが推測されてきた (Young et al., 2010, Huynen et al., 2012)。最近になっ

て、RF1mt の 55S リボソーム結合モデル構造が報告され、RF1mt は RF1Lmt と同様に、終止コドン UAA、UAG を認識する終結因子であると推測された。また、これまで終止コドン UAA、UAG 依存的な RF1mt の機能が検出されていない原因として、大腸菌 70S リボソームを用いている点が挙げられ、RF1mt は 55S リボソーム特異的にリボソーム上でペプチド解離活性を示すと推測された。

本研究では、様々なリボソーム複合体における RF1mt のペプチド解離活性を解析してきた。その結果、先行研究によって推測されてきた全ての場合において、RF1mt のペプチド解離活性は検出されなかった。すなわち、55S リボソームにおける A-site 終止コドン UAA またはセンスコドンの場合や、70S リボソームにおける A-site AGA コドンまたは mRNA が存在しない場合など、全ての状況において、RF1mt のペプチド解離活性は見られなかった。

これらを踏まえると、RF1mt は単独では機能できず、補助的因子と共同的にリボソームに結合することでペプチド解離活性を示す可能性が考えられる。原核生物では、終結因子 RF2 は ArfA の存在によってコドン非依存的なペプチド解離活性を示す。RF2/ArfA システムと同様にして、補助的因子の存在によってコドン非依存的またはコドン依存的にリボソームに結合するのかもしれない。また、真核生物の eRF1/eRF3 のように、eRF3 様因子と共同的に機能するのかもしれない。哺乳類ミトコンドリアには ArfA および RF3 に相当する遺伝子は存在せず、RF1mt と共同的に働く因子に関しては今後の研究が期待される。ミトコンドリア抽出液の存在によって RF1mt のペプチド解離活性が検出されるか、さらには、RF1mt の活性に必要な因子をミトコンドリア抽出液から探索することによって、RF1mt の機能に必要なタンパク質が同定できるだろう。また、RF1mt の免疫沈降によって、細胞内で RF1mt が相互作用するタンパク質を同定するのも有用である。

4.6 哺乳類ミトコンドリアのペプチド解離因子

哺乳類ミトコンドリアには GGQ モチーフを持つ class 1 release factor として RF1Lmt、RF1mt、ICT1、C12orf65 の 4 つの因子が存在する (図 5, Huynen et al., 2012)。このうち真核生物において ICT1 が最も広く保存されており (Duarte et al., 2012)、このような生物種を超えた広い分布はこれまで報告されてきた ICT1 の必須性と一致する。進化の過程において、ICT1/ArfB family は、終結因子 RF1、RF2 から派生して生じたものではなく、祖先由来の遺伝子あると考えられている。原核生物では、tmRNA が存在するために、ArfB の分布は狭まり、一方で、ミトコンドリアにおいては tmRNA が存在しないために、ICT1 が広く保存され、さらには、ミトコンドリアの環境に応じて、リボソームタンパク質として存在するようになったと推測される。ミトコンドリアにおいては、RNA 成分から構成され、二重膜を介した輸送に困難を要する tmRNA より、多機能なペプチド解離因子である ICT1 が、異常停止の解消因子として採用されたのだろう。

ミトコンドリアでは RF1Lmt、RF1mt、ICT1 の 3 つの因子が翻訳終結に関与するのかもしれない。13 種類の mtDNA コードタンパク質において、ICT1 は CO1 および ND6 mRNA の終結を担うなど、各遺伝子において特有の終結因子が存在する可能性が考えられる。さらには、ミトコンドリア内膜におけるタンパク質合成の生合成を感知することで、各終結因子の特異性が生み出されるのかもしれない。

ミトコンドリアタンパク質合成系における RF1mt と C12orf65 の役割の解明が、今後の大きな課題である。ICT1 のバックアップシステムとして存在するのかもしれないし、RF1mt、C12orf65 特有の新たな機能が存在するのかもしれない。今後の研究が期待される。

5 結論

- 本研究ではミトコンドリア 55S リボソームを用いて ICT1 の機能解析を行った。これにより、リボソームタンパク質として存在する ICT1 はペプチド解離活性を示さず、外来の ICT1 の存在によってのみ、リボソーム依存的コドン非依存的なペプチド解離活性が検出された。リボソームタンパク質として存在する ICT1 はペプチド解離反応に関与するリボソーム A-site 近傍とは異なる位置に結合することが示唆される。
- ICT1 はリボソーム A-site に mRNA が存在しない場合に最も高いペプチド解離活性を示した。一方で、A-site およびその下流に mRNA が存在する場合も、ミトコンドリア翻訳終結因子 RF1Lmt と同等のペプチド解離能を示した。さらには、mRNA が存在しないリボソームにおいてもペプチド解離活性を示し、多機能なペプチド解離因子であることが分かった。一方でこのような A-site mRNA 存在下におけるペプチド解離活性は、正常な翻訳反応を阻害し得る危険性が考えられる。しかし通常の翻訳過程では、リボソーム A-site においてコドン-アンチコドン相互作用を持つ因子（アミノアシル tRNA/EF-Tumt、RF1Lmt）がリボソームに優先的に入るために、ICT1 は通常の翻訳は阻害しないことが示唆された。
- GGQ モチーフを持つペプチド解離因子のうち、ICT1/ArfB にのみ特異的に存在する 25 残基の挿入領域は、ICT1/ArfB のペプチド解離活性に必須であり、リボソーム大サブユニットにおいて rRNA との相互作用を介して GGQ モチーフの適切な配向の固定に関与していると推測される。一方で、リボソームへの結合能は C-tail 領域によって決定されるため、挿入領域における変異体はリボソーム結合能自体には影響しないと考えられる。
- ICT1 は通常はリボソームに存在しており、異常停止によるリボソームの構造変化がシグナルとなりリボソームから解離すると考えられる。その後、ペプチド解離活性部位である A-site に結合し、ペプチジル tRNA の加水分解を行う。さらに、ICT1 は mRNA の途中における異常停止においても機能できることから、ミトコンドリアにおいて未だに終止コドン認識機構が明らかになっていない mRNA における、終結因子としての機能が推測される。

6 参考文献

Agrawal, R.K., Sharma, M.R., Kiel, M.C., Hirokawa, G., Booth, T.M., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Kaji, A., Frank, J. (2004). Visualization of ribosome-recycling factor on the Escherichia coli 70S ribosome: Functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8900–8905.

Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., Pedersen, A.M., Rodenburg, R.J., van der Knaap, M.S., Smeitink, J.A., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., *et al.* (2010). Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect. *Am J Hum Genet* *87*, 115-122.

Arnold, I., and Langer, T. (2002). Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* *1592*, 89-96.

Burger, G., Gray, M.W., Forget, L., and Lang, B.F. (2013). Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biol Evol* *5*, 418-438.

Buskirk, A.R., and Green, R. (2013). Biochemistry. Getting past polyproline pauses. *Science* *339*, 38-39.

Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., and Abo, T. (2012). ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in Escherichia coli. *Mol Microbiol* *86*, 37-50.

Chadani, Y., Ono, K., Kutsukake, K., and Abo, T. (2011). Escherichia coli YaeJ protein mediates a novel ribosome-rescue pathway distinct from SsrA- and ArfA-mediated pathways. *Mol Microbiol* *80*, 772-785.

Christian, B.E., and Spremulli, L.L. (2012). Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* *1819*, 1035-1054.

Doerfel, L.K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., and Rodnina, M.V. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* *339*, 85-88.

Duarte, I., Nabuurs, S.B., Magno, R., and Huynen, M. (2012). Evolution and diversification of the organellar release factor family. *Mol Biol Evol* *29*, 3497-3512.

Gagnon, M.G., Seetharaman, S.V., Bulkley, D., and Steitz, T.A. (2012). Structural Basis for the Rescue of Stalled Ribosomes: Structure of YaeJ Bound to the Ribosome. *Science* *335*, 1370-1372.

Gao, H., Zhou, Z., Rawat, U., Huang, C., Bouakaz, L., Wang, C., Cheng, Z., Liu, Y., Zavialov, A., Gursky, R., *et al.* (2007). RF3 induces ribosomal conformational changes responsible for dissociation of class I release factors. *Cell* 129, 929-941.

Gao, Y.G., Selmer, M., Dunham, C.M., Weixlbaumer, A., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2009). The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science* 326, 694-699.

Garza-Sanchez, F., Schaub, R.E., Janssen, B.D., and Hayes, C.S. (2011). tmRNA regulates synthesis of the ArfA ribosome rescue factor. *Mol Microbiol* 80, 1204-1219.

Goldschmidt-Reisin, S., Kitakawa, M., Herfurth, E., Wittmann-Liebold, B., Grohmann, L., and Graack, H.R. (1998). Mammalian mitochondrial ribosomal proteins. N-terminal amino acid sequencing, characterization, and identification of corresponding gene sequences. *J Biol Chem* 273, 34828-34836.

Greber, B.J., Boehringer, D., Leitner, A., Bieri, P., Voigts-Hoffmann, F., Erzberger, J.P., Leibundgut, M., Aebersold, R., and Ban, N. (2014). Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature* 505, 515-519.

Gueneau de Novoa, P., and Williams, K.P. (2004). The tmRNA website: reductive evolution of tmRNA in plastids and other endosymbionts. *Nucleic Acids Res* 32, D104-108.

Gutierrez, E., Shin, B.S., Woolstenhulme, C.J., Kim, J.R., Saini, P., Buskirk, A.R., and Dever, T.E. (2013). eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol Cell* 51, 35-45.

Hafez, M., Burger, G., Steinberg, S.V., and Lang, B.F. (2013). A second eukaryotic group with mitochondrion-encoded tmRNA: in silico identification and experimental confirmation. *RNA Biol* 10, 1117-1124.

Handa, Y., Hikawa, Y., Tochio, N., Kogure, H., Inoue, M., Koshiba, S., Guntert, P., Inoue, Y., Kigawa, T., Yokoyama, S., *et al.* (2010). Solution structure of the catalytic domain of the mitochondrial protein ICT1 that is essential for cell vitality. *J Mol Biol* 404, 260-273.

Handa, Y., Inaho, N., and Nameki, N. (2011). YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. *Nucleic Acids Res* 39, 1739-1748.

- He, S.L., and Green, R. (2010). Visualization of codon-dependent conformational rearrangements during translation termination. *Nat Struct Mol Biol* 17, 465-470.
- Huynen, M.A., Duarte, I., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., and Nabuurs, S.B. (2012). Structure based hypothesis of a mitochondrial ribosome rescue mechanism. *Biol Direct* 7, 14.
- Ito, K., and Chiba, S. (2013). Arrest peptides: cis-acting modulators of translation. *Annu Rev Biochem* 82, 171-202.
- Ito, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (2000). A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* 403, 680-684.
- Jorgensen, F., and Kurland, C.G. (1990). Processivity errors of gene expression in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 215, 511-521.
- Koc, E.C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M.B., Schlatzer, D.M., Moseley, A., and Spremulli, L.L. (2001). The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* 276, 43958-43969.
- Koc, E.C., Cimen, H., Kumcuoglu, B., Abu, N., Akpinar, G., Haque, M.E., Spremulli, L.L., and Koc, H. (2013). Identification and characterization of CHCHD1, AURKAIP1, and CRIF1 as new members of the mammalian mitochondrial ribosome. *Front Physiol* 4, 183.
- Kogure, H., Handa, Y., Nagata, M., Kanai, N., Guntert, P., Kubota, K., and Nameki, N. (2013). Identification of residues required for stalled-ribosome rescue in the codon-independent release factor YaeJ. *Nucleic Acids Res* doi: 10.1093/nar/gkt1280.
- Kogure, H., Hikawa, Y., Hagihara, M., Tochio, N., Koshihara, S., Inoue, Y., Guntert, P., Kigawa, T., Yokoyama, S., and Nameki, N. (2012). Solution structure and siRNA-mediated knockdown analysis of the mitochondrial disease-related protein C12orf65. *Proteins* 80, 2629-2642.
- Korostelev, A., Asahara, H., Lancaster, L., Laurberg, M., Hirschi, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Scott, W.G., and Noller, H.F. (2008). Crystal structure of a translation termination complex formed with release factor RF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19684-19689.
- Kosolapov, A., and Deutsch, C. (2009). Tertiary interactions within the ribosomal exit tunnel. *Nat Struct Mol Biol* 16, 405-411.

- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., and Noller, H.F. (2008). Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* 454, 852-857.
- Lind, C., Sund, J., and Aqvist, J. (2013). Codon-reading specificities of mitochondrial release factors and translation termination at non-standard stop codons. *Nat Commun* 4, 2940.
- Liu, M., and Spremulli, L. (2000). Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *J Biol Chem* 275, 29400-29406.
- Manley, J.L. (1978). Synthesis and degradation of termination and premature-termination fragments of beta-galactosidase in vitro and in vivo. *J Mol Biol* 125, 407-432.
- Moore, S.D., and Sauer, R.T. (2007). The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu Rev Biochem* 76, 101-124.
- Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T., and Ueda, T. (2005). Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *J Biol Chem* 280, 19721-19727.
- Neubauer, C., Gillet, R., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2012). Decoding in the absence of a codon by tmRNA and SmpB in the ribosome. *Science* 335, 1366-1369.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.
- Nozaki, Y., Matsunaga, N., Ishizawa, T., Ueda, T., and Takeuchi, N. (2008). HMRF1L is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG. *Genes Cells* 13, 429-438.
- Ott, M., and Herrmann, J.M. (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim Biophys Acta* 1803, 767-775.
- Pech, M., and Nierhaus, K.H. (2012). Three mechanisms in Escherichia coli rescue ribosomes stalled on non-stop mRNAs: one of them requires release factor 2. *Mol Microbiol* 86, 6-9.
- Perez-Martinez, X., Butler, C.A., Shingu-Vazquez, M., and Fox, T.D. (2009). Dual functions of Mss51 couple synthesis of Cox1 to assembly of cytochrome c oxidase in Saccharomyces cerevisiae mitochondria. *Mol Biol Cell* 20, 4371-4380.

- Rackham, O., and Filipovska, A. (2013). Supernumerary proteins of mitochondrial ribosomes. *Biochim Biophys Acta* doi: 10.1016/j.bbagen.2013.08.010.
- Richter, R., Rorbach, J., Pajak, A., Smith, P.M., Wessels, H.J., Huynen, M.A., Smeitink, J.A., Lightowlers, R.N., and Chrzanowska-Lightowlers, Z.M. (2010). A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *Embo j* 29, 1116-1125.
- Schaub, R.E., Poole, S.J., Garza-Sanchez, F., Benbow, S., and Hayes, C.S. (2012). Proteobacterial ArfA peptides are synthesized from non-stop messenger RNAs. *J Biol Chem* 287, 29765-29775.
- Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spremulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* 115, 97-108.
- Shimizu, Y. (2012). ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes. *J Mol Biol* 423, 624-631.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* 19, 751-755.
- Shoemaker, C.J., and Green, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, E1392-1398.
- Soleimanpour-Lichaei, H.R., Kuhl, I., Gaisne, M., Passos, J.F., Wydro, M., Rorbach, J., Temperley, R., Bonnefoy, N., Tate, W., Lightowlers, R., *et al.* (2007). mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. *Mol Cell* 27, 745-757.
- Spremluli, L.L. (2007). Large-scale isolation of mitochondrial ribosomes from mammalian tissues. *Methods Mol Biol* 372, 265-275.
- Surovtseva, Y.V., Shutt, T.E., Cotney, J., Cimen, H., Chen, S.Y., Koc, E.C., and Shadel, G.S. (2011). Mitochondrial ribosomal protein L12 selectively associates with human mitochondrial RNA polymerase to activate transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17921-17926.
- Suzuki, T., and Nagao, A. (2011). Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet* 45, 299-329.
- 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, 21724-21736.

Taylor, D., Unbehaun, A., Li, W., Das, S., Lei, J., Liao, H.Y., Grassucci, R.A., Pestova, T.V., and Frank, J. (2012). Cryo-EM structure of the mammalian eukaryotic release factor eRF1-eRF3-associated termination complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18413-18418.

Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowers, R.N., and Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010a). Hungry codons promote frameshifting in human mitochondrial ribosomes. *Science* 327, 301.

Temperley, R.J., Wydro, M., Lightowers, R.N., and Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010b). Human mitochondrial mRNAs--like members of all families, similar but different. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1081-1085.

Tourigny, D.S., Fernandez, I.S., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2013). Elongation factor G bound to the ribosome in an intermediate state of translocation. *Science* 340, 1235490.

Triana-Alonso, F.J., Chakraborty, K., and Nierhaus, K.H. (1995). The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor. *J Biol Chem* 270, 20473-20478.

Triana, F., Nierhaus, K.H., and Chakraborty, K. (1994). Transfer RNA binding to 80S ribosomes from yeast: evidence for three sites. *Biochem Mol Biol Int* 33, 909-915.

Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., Nierhaus, K.H., and Takeuchi, N. (2009). EF-G2mt Is an Exclusive Recycling Factor in Mammalian Mitochondrial Protein Synthesis. *Molecular Cell* 35, 502-510.

Ude, S., Lassak, J., Starosta, A.L., Kraxenberger, T., Wilson, D.N., and Jung, K. (2013). Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339, 82-85.

van Belzen, N., Diesveld, M.P., van der Made, A.C., Nozawa, Y., Dinjens, W.N., Vlietstra, R., Trapman, J., and Bosman, F.T. (1995). Identification of mRNAs that show modulated expression during colon carcinoma cell differentiation. *Eur J Biochem* 234, 843-848.

van Belzen, N., Dinjens, W.N., Eussen, B.H., and Bosman, F.T. (1998). Expression of differentiation-related genes in colorectal cancer: possible implications for prognosis. *Histol Histopathol* *13*, 1233-1242.

Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2011). The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Curr Opin Struct Biol* *21*, 274-282.

Woolstenhulme, C.J., Parajuli, S., Healey, D.W., Valverde, D.P., Petersen, E.N., Starosta, A.L., Gudyosh, N.R., Johnson, W.E., Wilson, D.N., and Buskirk, A.R. (2013). Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, E878-887.

Yassin, A.S., Haque, M.E., Datta, P.P., Elmore, K., Banavali, N.K., Spremulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2011). Insertion domain within mammalian mitochondrial translation initiation factor 2 serves the role of eubacterial initiation factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 3918-3923.

Young, D.J., Edgar, C.D., Murphy, J., Fredebohm, J., Poole, E.S., and Tate, W.P. (2010). Bioinformatic, structural, and functional analyses support release factor-like MTRF1 as a protein able to decode nonstandard stop codons beginning with adenine in vertebrate mitochondria. *Rna* *16*, 1146-1155.

設楽浩志、曹麗琴、米川博通 (2010) 哺乳動物におけるミトコンドリア DNA の遺伝様式、細胞工学 Vol 29、No. 5、461-465、秀潤社

米川博通、設楽浩志、Liqin Cao (2008) 哺乳類におけるミトコンドリアボトルネック効果、実験医学 Vol 26、No.13、2047-2052、羊土社

7 謝辞

本研究を行うに当たり、指導教員である富田野乃准教授に深く感謝致します。大学院に入学してから長い間、実験の細かい技術から研究生活のあり方まで、幅広くご指導して頂きました。研究知識と技術が非常に未熟な私にも関わらず、常に研究が良い方向に向かうように様々なアドバイスをして頂き、非常に多くのことを学ばせて頂きました。心から御礼申し上げます。

上田卓也教授には、富田野乃准教授とともに、素晴らしい研究環境を提供して頂き、深く御礼申し上げます。充実した実験器具など、非常に恵まれた環境の下で実験を進めることができました。また研究セミナーや発表練習においては研究方針を含め多くのご指導を頂き、深く感謝致します。

産業技術総合研究所グループリーダーの富田耕造博士には、構造解析に関するご指導を頂きました。深く感謝致します。

東京大学生命分子遺伝学分野の伊藤耕一教授には、大腸菌における遺伝学についてご指導頂きました。深く感謝致します。

また分子医科学分野の中で研究を進めるに際して、小谷哲也博士には基礎的な実験から研究方針まで多くのことをアドバイス頂きました。深く御礼申し上げます。分子医科学分野において素晴らしい研究生活を送ることができ、分子医科学分野の皆様にご心から感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

2014 年

赤羽しおり