

論文の内容の要旨

論文題目

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)

氏名 赤羽 しおり

1 背景・目的

ミトコンドリア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 には 13 個の蛋白質がコードされており、全てミトコンドリア内膜中の呼吸鎖複合体を構成する膜蛋白質となっている。これらは、ミトコンドリア独自の蛋白質合成系によって、蛋白質に合成され、ミトコンドリア内膜に挿入される。

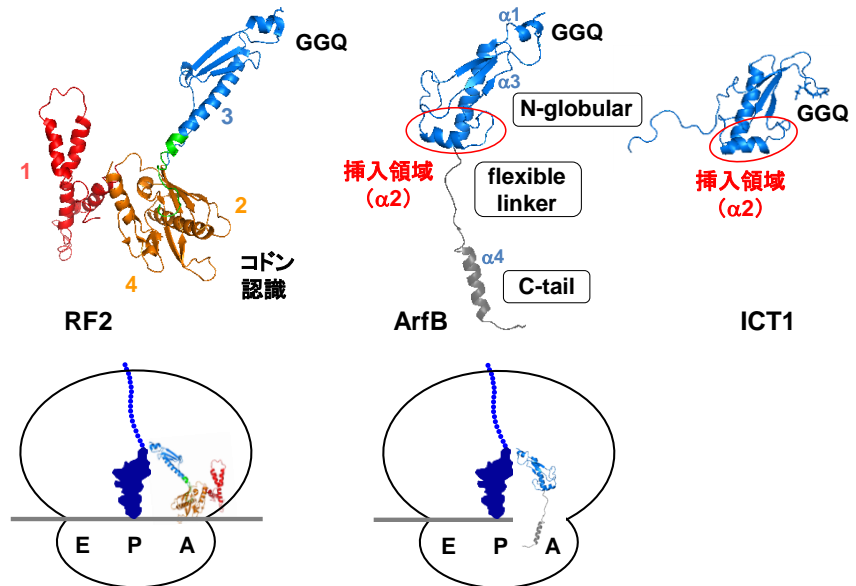
生体内における蛋白質合成は、開始・伸長・終結・リボソーム再生の 4 つの段階からなる。生体内では、様々な理由で翻訳伸長反応が異常停止 (stalling) してしまう場合があり、異常停止したリボソーム複合体は生体にとって有害となるため、このような状態に対する解消機構が存在する。大腸菌には、異常停止の解消機構として 3 つの機構が存在する (tmRNA、ArfA (alternative ribosome-rescue factor A、別名 YhdL)、ArfB (alternative ribosome-rescue factor B、別名 YaeJ))。このうち tmRNA は原核生物に広く保存されており、原核生物の異常停止解消における主要な機構となっている。一方で、哺乳類ミトコンドリアには tmRNA や ArfA に対応する因子は存在せず、ArfB の真核生物ホモログである ICT1 のみが存在する。

ICT1 (immature colon carcinoma transcript-1) はミトコンドリアに局在し、真核生物において広く保存された、生育に必須の蛋白質である。ICT1 および大腸菌ホモログ ArfB は、翻訳終結因子 RF1、RF2 のドメイン 3 の領域から成り、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が、コドン認識領域を欠いている (図 1)。これと一致して、ICT1 および ArfB に関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報告されている⁽¹⁾⁽²⁾。真核生物の ICT1 とバクテリアの ArfB は、異常停止の解消において同様の機能を持つと考えられているものの、2 つの因子の相違点として、ICT1 はリボソーム蛋白質であり、大サブユニットの構成因子 MRPL58 (mitochondrial ribosomal protein

L58) として同定されている³⁾。これまで、ペプチド解離因子として働くリボソーム蛋白質については例がなく、リボソーム構成因子である ICT1 がどのようにして異常停止の解消において働くことができるのかは明らかになっていない。これまで ICT1 のペプチド解離能に関する解析は全て大腸菌 70S リボソームを用いたヘテロな系のみが用いられてきており、ICT1 の生理的役割を考慮した詳細な機能解析のためには、ミトコンドリア 55S リボソームを用いた解析が必要であると考えられる。

本研究は、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を明らかにすることを目的とし、ICT1

の機能解析を行った。ICT1 がリボソーム構成因子であることを考慮し、ミトコンドリア 55S リボソームを用いて ICT1 のペプチド解離能を調べた。また、ICT1 の基質特異性について評価し、ICT1 および ArfB に特異的に存在する 25 残基挿入領域 (図 1) についてその役割を解析した。



2 実験結果

図1 終結因子RF2とArfB、ICT1の構造比較

(1) 55S リボソームにおける ICT1 の機能解析

始めに、豚肝臓ミトコンドリアから精製した 55S リボソームについて、western blotting によって、ICT1 の局在を解析した。その結果、ICT1 が 55S リボソームおよび 39S リボソーム大サブユニットに存在することが確認され、1:1 の化学量論比で結合していることが示された (図 2A)。

次に、*in vitro* 55S peptide release assay を行い、上記の 55S リボソームにおける ICT1 のペプチド解離能を検証した。ac[³H]Phe-tRNA^{Phe}/mRNA/55S リボソーム複合体における ac[³H]Phe の解離を解析したところ、A-site のコドンに関係なく、ICT1 のペプチド解離活性が検出された (図 2B)。さらに、ICT1 は mRNA 非存在下でもリボソーム依存的なペプチド解離活性を持つことが示された (図 2C)。また、リボソーム

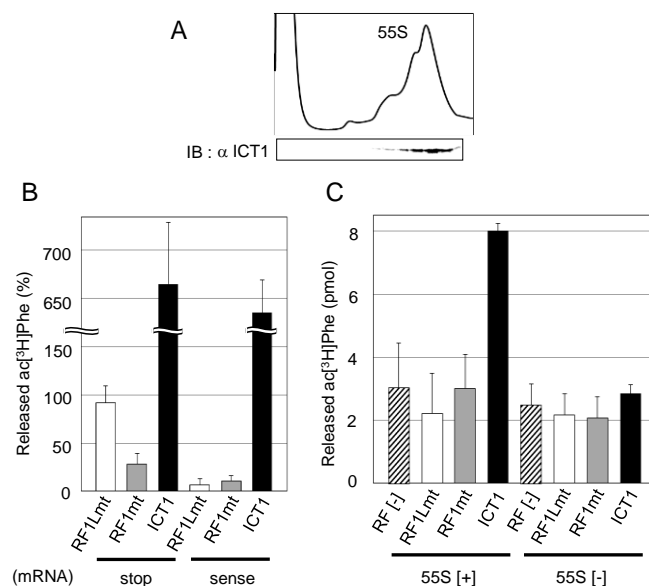


図2 55SリボソームにおけるICT1の機能解析

A: ミトコンドリア55Sリボソームのwestern blotting解析
B, C: mRNA存在(B)、非存在(C)下における*in vitro* 55S peptide release assay

単独ではペプチド解離活性が検出されず、外来の ICT1 の添加によってのみペプチド解離が引き起こされることが分かった。従って、リボソーム蛋白質として存在する ICT1 はペプチド解離には関与せず、外来の ICT1 が結合するペプチド解離活性部位とは異なる部位に結合することが示唆された。

(2) ICT1 の基質特異性解析

次に ICT1 が基質とする異常停止の状態について調べるために、大腸菌由来無細胞蛋白質合成系を用いた *in vitro* multi-round translation assay (図 3)、大腸菌 polysome を用いた polysome breakdown assay を行った。その結果、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 (図 3、左)、また、A-site およびその下流に 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 (図 3、中央、右)。

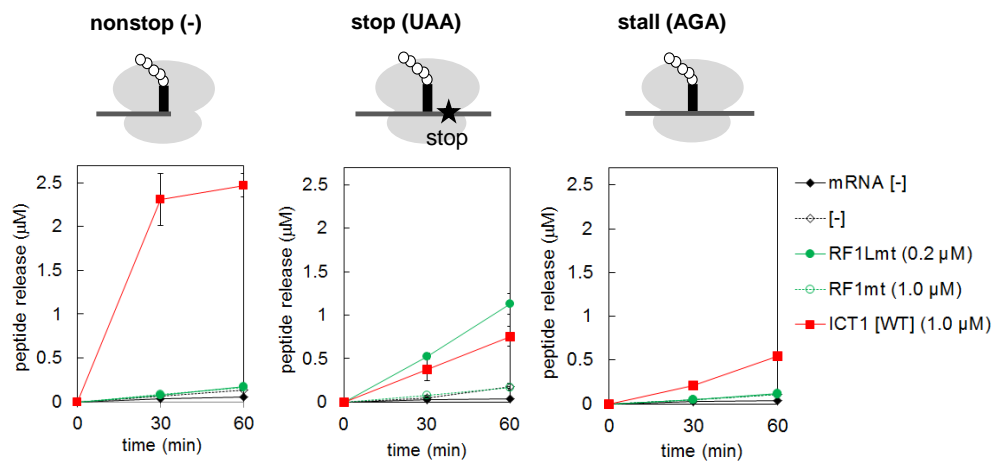


図3 *in vitro* multi-round translation assayによるICT1の基質特異性解析

(3) ICT1 25 残基挿入領域の機能解析

ICT1/ArfB の機能部位として、ペプチド解離反応に重要な GGQ モチーフ、リボソームとの結合に必須である C- tail 領域が知られている (図 1) (2)(4)。これらの機能部位に加えて、ICT1/ArfB には終結因子 RF1、RF2 には見られない、 α -ヘリックス構造を含む 25 残基の挿入領域が存在する (図 1)。本研究では、この挿入領域が、リボソームとの相互作用を通して GGQ モチーフの適切な配向の固定に関与していると推測した。挿入領域の役割を調べるために、この領域における、3つの塩基性アミノ酸を同時にアラニンに置換した変異体 ICT1 [$\alpha 2$] を作成し、その機能を調べた。

in vitro 55S peptide release

assay、*in vitro* multi-round translation assay (図 4A)、polysome breakdown assay 全てにおいて、ICT1 [$\alpha 2$] 変異体のペプチド解離活性の消失が見られた。また、リボソームとの結合能を解析したところ、ICT1 [$\alpha 2$] 変異体は ICT1

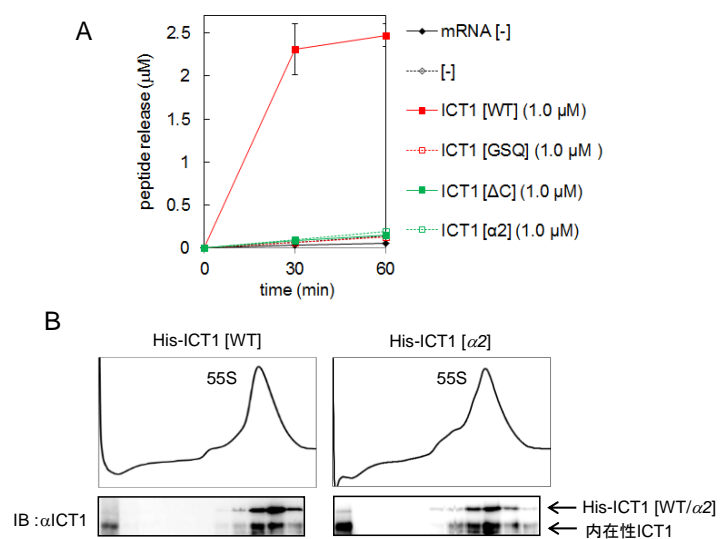


図4 挿入領域変異体ICT1 [$\alpha 2$]の機能解析

A : *in vitro* multi-round translation assayによるペプチド解離能解析
B : western blottingによる55Sリボソームにおける結合能解析

[WT]と同様にリボソームに結合できることが分かった (図 4B)。従って、ICT1/ArfB に特有の 25 残基挿入領域は、リボソームとの結合自体には影響しないが、リボソームとの相互作用を通して GGQ モチーフを適切に配向することにより、ペプチド解離反応に関与していると考えられる。

3 まとめと考察

本研究では、リボソーム蛋白質として存在する ICT1 はペプチド解離反応には関与しないことが示された。リボソームに存在する ICT1 はペプチド解離活性部位とは異なる部位に結合し、外来から ICT1 がリボソームに結合することでペプチド解離活性を示すことが示唆された。

mtDNA にコードされた蛋白質は全て膜蛋白質であり、ミトコンドリアにおける蛋白質合成は膜挿入過程と連動して起きていると考えられている⁽⁶⁾。また、現在のところ、ICT1 はミトコンドリアにおいてリボソームのみに局在し、マトリックス画分における ICT1 の存在は確認されていない。従って、ICT1 の異常停止解消における作用機序は次のように推測できる (図 25)。(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蛋白質として存在する 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。

さらに、ICT1 の終結因子としての役割も推測される。mtDNA にコードされる 13 個の遺伝子のうち、CO1 と ND6 は、終始コドンが AGA および AGG となっている。これらのコドンを認識する終結因子は未だに見つかっておらず、終結機構は明らかになっていない。ICT1 は mRNA の途中における異常停止リボソーム複合体においてもペプチド解離を行うことから、CO1 および ND6 mRNA における終結因子としての役割を担うと考えられる。

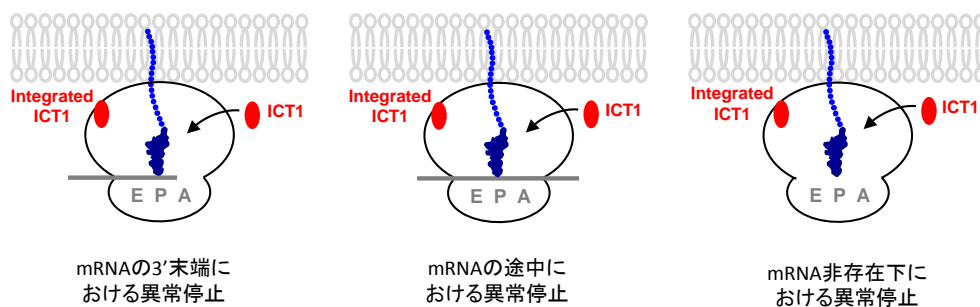


図5 ICT1は様々な異常停止リボソーム複合体において機能する

4 参考文献

- (1) Richter, R. et al., *Embo j.* (2010) 29 : 1116-1125
- (2) Handa, Y. et al., *Nucleic Acids Res.* (2011) 39 : 1739-1748
- (3) Koc, E.C. et al., *Front Physiol.* (2013) 4 : 183
- (4) Gagnon, M.G. et al., *Science* (2012) 335 : 1370-1372
- (5) Ott, M., and Herrmann, J.M., *Biochim Biophys Acta.* (2010) 1803 : 767-775