



Studies on the structure and expression of mitochondrial ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*

Matsushita, Yasuhiko

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

1991-03-31

(Date of Publication)

2015-03-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0978

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3057162>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000978>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



| | |
|---------|---|
| 氏名・（本籍） | まつ した やす ひこ 松 下 保 彦 （兵庫県） |
| 学位の種類 | 学 術 博 士 |
| 学位記番号 | 学博い第176号 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第1項該当 |
| 学位授与の日付 | 平成3年3月31日 |
| 学位論文題目 | Studies on the Structure and Expression of Mitochondrial Ribosomal Protein Genes in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . 〔パン酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) ミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子の構造と発現に関する研究〕 |
| 審査委員 | 主査 教授 磯野克己 教授 王子善清 教授 新家 龍 |

論 文 内 容 の 要 旨

生物が、自己の複製し生命活動を維持していくためには、非常に多くの遺伝情報が、秩序をもって、かつ、環境と連携して発現されなければならない。そのためには、生体内、あるいは、細胞内の異なる場所に存在している遺伝情報が協調的に発現することが必要である。このような高次元の遺伝情報発現の調節がどのようにおこなわれているかということは非常に興味深い問題である。そこで、真核生物のミトコンドリアを構成する遺伝子間の発現調節に着目し、遺伝的解析の簡単なパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のミトコンドリアに焦点をあてて研究をおこなった。

ミトコンドリアは独自の転写翻訳系を持つ細胞内オルガネラであり、その遺伝情報の一部はミトコンドリアの DNA 上にあるが、多くは核の DNA に存在している。このことから、細胞内の異なる場所からの遺伝情報の発現がどのように調節されているのかということを研究するのに適している。また、ミトコンドリアは原核生物の共生により生じたのではないかと考えられており、その証拠が蓄積してきている。そうだとすると、現在核に存在しているミトコンドリアの遺伝子の多くは、進化の過程でミトコンドリアから核へ移行したことになる。ミトコンドリアを研究することはこのような進化的観点からも非常に興味深い。

ミトコンドリアを構成している高分子複合体のうち、ミトコンドリアのリボソームは、核の遺伝子産物（約80種類の蛋白質）とミトコンドリアの遺伝子産物（15S rRNA , 21S rRNA と1つ又は数種類の蛋白質）とにより構成されており、また、それを構成している分子種が多い。したがって、細胞内の異なる場所からの遺伝情報発現とその相互作用、およびミトコンドリアから核への遺伝子の移

行、という上述した2つの点を研究する上で適した研究対象である。そこで本研究では、パン酵母の核に存在するミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子のクローニングを行い、クローン化した遺伝子を用いて上述の点の一端を明らかにすることを目指した。

まずはじめに、多くのミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子を効率よくクローン化することを計画した。この目的で、個々のミトコンドリアリボソーム蛋白質を分離精製し、7種の蛋白質のN末端のアミノ酸配列を決定した。このうち、YMR31およびYMR44と名付けた2種類の蛋白質について、決定したアミノ酸配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、それをプローブとしてスクリーニングをすることによりそれぞれの遺伝子をクローン化した。次に、これらの遺伝子の全塩基配列を決定し、構造的特徴を明らかにした。その結果、YMR31蛋白質は369塩基対から成る遺伝子から作られ、塩基配列とアミノ酸配列の比較の結果、N末端の初めの8アミノ酸残基は短いleader sequenceであることが明らかになった。これは、今までに知られているミトコンドリア蛋白質のleader sequenceのうち最も短い例である。塩基配列から予想されるYMR31蛋白質の分子量は、leader sequenceを除いて12,792であった。一方、YMR44蛋白質の遺伝子は147bpのイントロンを含み、2つのエキソンの長さはあわせて294bpで、それから予想される蛋白質の分子量は11,476であった。酵母ミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子のうちでイントロンをもつのはこれがはじめての例である。YMR31蛋白質とちがって、YMR44蛋白質のN末端にはleader sequenceは存在しなかった。塩基配列データベースを用いてホモロジー検索を行ったが、これら2つの蛋白質と相同性のあるものは見つからなかった。また、遺伝子破壊実験の結果、YMR31遺伝子はミトコンドリアの機能にとって必ずしも必要ではないということが明らかになった。さらに、YMR31遺伝子は第6染色体上にYMR44遺伝子は第13または第16染色体上に存在することが判明した。このようなYMR31遺伝子とYMR44遺伝子の構造的特徴と染色体上の位置などを、現在までに報告されている他の例と比較することにより、ミトコンドリアリボソーム蛋白質には、そのN末端にleader sequenceをもつものもたないものがあること、大腸菌のリボソーム蛋白質と相同性のあるものもないものがあること、および、ミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子は染色体上に散在しているらしいことなどが明らかになり、ミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子には核からミトコンドリアへ移行したものとともと核にあった遺伝子がミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子として使われるようになったものがあるのではないかとことや、ミトコンドリアから核への遺伝子の移行はmRNAを介して行われたのではないかとすることが推測された。

次に、ミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子の発現が核とミトコンドリアの間でどのように調節されているかを調べるために、YMR31遺伝子とYMR44遺伝子を始めとする7種のミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子をプローブとして、ミトコンドリアDNAをもつ[rho⁺]株とミトコンドリアDNAをもたない[rho⁰]株を用い、種々の培養条件下でそれらの遺伝子の転写産物の量を調べた。その結果、調べたすべての遺伝子について、ミトコンドリアのrRNAが作られない[rho⁰]株でも転写は行われていること、[rho⁺]株と[rho⁰]株のどちらにおいても培地中のグルコースにより転写は抑制されるがその程度は両者で異なっていること、[rho⁰]株における転写産物の量

は [rho⁺] 株に比べて多いことなどが明らかになった。これらのことは、ミトコンドリア DNA の有無が核に存在する遺伝子の発現に影響を与えるということを示唆する。さらに、N末端に leader sequence をもたない蛋白質の遺伝子 *MRP-L8* と *MRP-L33* の転写産物の量は、N末端に leader sequence をもつ蛋白質の遺伝子 *MRP-L20* と *MRP-L31* の転写産物の量より多いという結果から、leader sequence のない蛋白質はミトコンドリアへの輸送の効率が低く、それを補うために転写産物の量が多くなっているのではないかとということが考えられた。

ミトコンドリアへの蛋白質の輸送は、核に存在する遺伝子の産物がミトコンドリアで機能するためのひとつの重要な段階である。これまでに研究されてきたミトコンドリアリボソーム蛋白質以外のほとんどのミトコンドリアの蛋白質はN末端に leader sequence をもち、それによりミトコンドリアへ輸送されることが知られている。*YMR31* と *YMR44* 遺伝子を含むミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子の構造の比較から、いくつかの蛋白質ではそのC末端部がミトコンドリアへの輸送のためのシグナルとして働いているのではないかとということが予想された。この可能性を検討するために、そのような蛋白質の1つである YmL8 について、C末端部の機能解析を行った。この目的のために、YmL8 の遺伝子 *MRP-L8* の 3' 末端部を欠失したもののシリーズを1コピーまたは多コピーのプラスミドに結合し、染色体上の *MRP-L8* 遺伝子を破壊した細胞中での発現と機能を相補性により調べた。YmL8 のC末端が10アミノ酸残基欠けた場合には、多コピーのプラスミド上にあるときにのみ相補性がみられた。C末端部をさらに欠失したときには、どちらの場合でも相補性がみられなかった。これらのことから、YmL8 蛋白質のC末端部はこの蛋白質のミトコンドリアへの輸送あるいはリボソームへの会合あるいはその両方にとって重要であるということが示唆された。

以上のように本研究では遺伝子発現における核とミトコンドリアの相互作用と核に存在するミトコンドリアの遺伝子の進化的意味を明らかにすることを目的として、ミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子をクローン化し、その遺伝子構造、転写産物、ミトコンドリアへの輸送の機構を解析した。今後、本研究で得られた知見をもとに遺伝情報発現の高次元の調節機構や、ミトコンドリアの遺伝子の進化的解析をさらに深めていきたい。

論文審査の結果の要旨

生物が、自己を複製し生命活動を維持していくためには、生体内あるいは細胞内の異なる場所に存在している遺伝情報が協調的に発現することが必要である。したがってそのようなより高次元の遺伝情報発現の調節がどのようにおこなわれているかということは興味深い問題である。本研究で学位申請者は、遺伝的解析の容易なパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のミトコンドリアを構成する遺伝子間の発現調節に焦点をあてて、このような観点からの研究をおこなった。

ミトコンドリアは独自の転写翻訳系を持つ細胞内オルガネラであり、その遺伝情報の一部はミトコンドリアのDNA上に、他の多くは核のDNAに存在しており、上記の目的に適した研究対象である。また、ミトコンドリアは原核生物の共生によりできたのではないかと考えられており、その証拠が蓄

積ってきている。したがって、現在核に存在しているミトコンドリアの遺伝子の多くは、進化の過程でミトコンドリアから核へ移行したものであるということになり、このような研究を遂行することは進化的観点からも興味深い。

まずはじめに学位申請者は、多くのミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子を効率よくクローン化することを計画し、個々のミトコンドリアリボソーム蛋白質を分離精製し、7種の蛋白質のN末端のアミノ酸配列を決定した。このうち、YMR31およびYMR44と名付けた2種類の蛋白質について、決定したアミノ酸配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、それを利用することによりそれぞれの遺伝子をクローン化した。次に、これらの遺伝子の全塩基配列を決定し、構造的特徴を明らかにした。その結果、YMR31蛋白質は369塩基対から成る遺伝子から作られ、8アミノ酸残基の短い leader sequence をもつことを明らかにした。これは、今までに知られているミトコンドリア蛋白質の leader sequence のうち最も短い例である。一方、YMR44蛋白質の遺伝子は酵母ミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子のうちではじめての例として147bpのイントロンを含み、その産物はN末端には leader sequence はもたない蛋白質であることが分かった。塩基配列データベースを用いて行った類似検索からは、これらの2つの蛋白質と相同性のものは見つからなかった。また、遺伝子破壊実験の結果、YMR31遺伝子はミトコンドリアの機能にとって必ずしも必要ではないということを示唆した。さらに、YMR31遺伝子は第6染色体上にYMR44遺伝子は第13または第16染色体上に存在することを見いだした。このようなYMR31遺伝子とYMR44遺伝子の構造的特徴と染色体上の位置などを、現在までに報告されている他の例と比較することにより、学位申請者は、ミトコンドリアリボソーム蛋白質には、そのN末端に leader sequence をもつものももたないものがあること、大腸菌のリボソーム蛋白質と相同性のあるものもないものがあること、および、ミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子は染色体上に散在しているらしいことなどを明らかにし、ミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子には核からミトコンドリアへ移行したものととも核にあった遺伝子がミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子として使われるようになったものがあるのではないかとことや、ミトコンドリアから核への遺伝子の移行は mRNA を介して行われたのではないかとことを推測している。

次いで学位申請者は、ミトコンドリアのリボソーム蛋白質遺伝子の発現が核とミトコンドリアの間でどのように調節されているかを調べるために、種々の培養条件下で7種のミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子の転写産物の量を調べた。その結果から、ミトコンドリア DNA の有無が核に存在する遺伝子の発現に影響を与えるということを示唆するデータを得ている。さらに、N末端に leader sequence をもたない蛋白質の遺伝子の転写産物の量は、もつ蛋白質の遺伝子の転写産物の量より多いという結果から、leader sequence のない蛋白質はミトコンドリアへの輸送の効率が低く、それを補うために転写産物の量が多くなっているのではないかとことを推測している。

ミトコンドリアへの蛋白質の輸送は、核に存在する遺伝子の産物がミトコンドリアで機能するためのひとつの重要な段階である。これまでに研究されてきたミトコンドリアリボソーム蛋白質以外のほとんどミトコンドリアの蛋白質はN末端に leader sequence をもち、それによりミトコンドリアへ

輸送されることが知られている。*YMR31*と*YMR44*遺伝子を含むミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子の構造の比較から、いくつかの蛋白質ではそのC末端部がミトコンドリアへの輸送のためのシグナルとして働いているのではないかということが予想された。この可能性を検討するために、そのような蛋白質の1つであるYmL8について、C末端部の機能解析を行った。この実験結果から、YmL8蛋白質のC末端部はこの蛋白質のミトコンドリアへの輸送あるいはリボソームへの会合あるいはその両方にとって重要であるということを示唆する結果を得ている。

以上のように本研究で学位申請者は、遺伝子発現における核とミトコンドリアの相互作用と核に存在するミトコンドリアの遺伝子の進化的意味を明らかにすることを目的として、ミトコンドリアリボソーム蛋白質遺伝子をクローン化し、その遺伝子構造、転写産物、ミトコンドリアへの輸送の機構を解析した。これらの研究成果は、細胞内での高次な遺伝子発現の制御機構に関する分子遺伝学の発展に寄与するところが大きい。

したがって学位申請者 松下保彦は充分学術博士の学位に値すると判断される。