



# On the mitochondrial ribosome synthesis and genetic interactions between the nucleus and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*

Kang, Wonkyung

---

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

1991-03-31

(Date of Publication)

2015-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0979

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3057163>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000979>

※ 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・(国籍)	カン 姜	ウォン 媛	キョン 瓊	(韓国)
学位の種類	学 術 博 士			
学位記番号	学博い第177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	On the Mitochondrial Ribosomal Synthesis and Genetic Interactions between the Nucleus and Mitochondria in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . 〔パン酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) のミトコンドリアリボソーム合成における核とミトコンドリアの遺伝的相互作用〕			
審査委員	主査 教授 磯野 克己 教授 團野 源一 教授 名武 昌人			

### 論 文 内 容 の 要 旨

真核細胞は膜によって仕切られたオルガネラ（細胞内小器官）を持つことが特徴であるが、このようなオルガネラのうち、ミトコンドリアと葉緑体は核とは別に独自の DNA を持ち、独自の転写・翻訳系を持つことが知られている。しかし、これらのオルガネラの構造と機能に必要な遺伝子の多くは、オルガネラの DNA でなく核の DNA に存在している。したがって核の遺伝子に由来するオルガネラの蛋白質は、細胞質で合成された後、オルガネラへ輸送されなければならない。そのため、これらがミトコンドリア DNA 由来の産物と複合する場合、核に存在する遺伝子とミトコンドリアに存在する遺伝子の両者が協調的に発現することが必要である。このような細胞内の異なる場所からの遺伝情報の発現にどのような調節機構が存在しているのかということは興味深い問題である。

ミトコンドリアや葉緑体は、原核生物が共生してできたのではないかと考えられており、その証拠が蓄積されてきている。そうだとすると、現在核に存在しているミトコンドリアや葉緑体で機能している蛋白質の遺伝子は、進化の過程でオルガネラから核へ移行したものであるか、あるいは元々は核の遺伝子産物であったものがミトコンドリアで利用されるように変化したものであるということになる。

パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のミトコンドリアリボソームはミトコンドリア DNA 由来の2種類の RNA 分子と1種類の蛋白質、および核の遺伝子に由来する数十種類の蛋白質からなり、上述のような点を調べるのに適した対象である。さらに、パン酵母は遺伝的解析が容易であり、これまでに行われてきた多くの遺伝学的解析の蓄積がある。そこで、私はパン酵母のミトコンドリアリボソームに着目し、核に存在するリボソーム蛋白質の遺伝子の解析を行った。そのためにまず、酵

母から分離精製した数種のミトコンドリアリボソーム蛋白質のN末端部のアミノ酸配列を決定し、それをもとにこれまでに2種類の蛋白質(YMR26, YmL33)の遺伝子をクローン化した。

YMR26蛋白質の遺伝子のクローンはそのアミノ酸配列の一部に対応する32merの oligonucleotide を合成し、それをプローブとして用いて行った。この合成 oligonucleotide の5'末端を標識し、酵母の genomic DNA を *Bam* HI, *Hin* dIII, *Pst* I で切断した後、Southern hybridization を行った。その結果得られたバンドのうち、大きさの一番小さい4.4kb の *Pst* I 断片をクローン化し、調べたところ、YMR26の遺伝子を含んでいることがわかったので、クローン化した部分の塩基配列を決定した。YMR26遺伝子は474塩基対からなり、分子量約18.5kDaの塩基性蛋白質をコードしていることがわかった。この塩基配列から予想されるアミノ酸配列は開始コドンの直後からN末端部のアミノ酸配列と一致しており、従って presequence をもたないことが示唆される。

一方、YmL33蛋白質の遺伝子についてはこの蛋白質のN末端部のアミノ酸配列を40残基近く決定できたので、それに基づいて二種類の oligonucleotides を合成し、これらを primer として用い、genome DNA を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子部分の増幅を試みた。その結果、アミノ酸配列から予想される長さに当たる DNA band が検出できたので、その PCR 産物を vector につなぎ、塩基配列決定を行った。その結果、YmL33のN末端部アミノ酸配列を完全に含んでいることがわかった。そこで、この PCR 産物をプローブとして用いることにより、YmL33蛋白質の遺伝子を含む約2kbの *Hin* dIII 断片をクローン化することができた。次に、このクローンの塩基配列を決定した。YmL33 は297塩基対からなる遺伝子にコードされており、YMR26と同様 presequence をもたないことがわかった。この MRP-L33遺伝子産物 (YmL33) のアミノ酸配列のN末端側の約2/3は大腸菌 (*Escherichia coli*) および *Bacillus stearothermophilus* のリボソーム蛋白質L30とかなり高い類似性を示した。またC末端側の1/3については程度は低いが、酵母の細胞質のリボソーム蛋白質L16と類似性を示していることがわかった。

次に、これら二つの遺伝子がどの染色体上に位置しているかを調べた。そのため、酵母の染色体を Pulse-field 電気泳動法により分離させたものを、YMR26およびYmL33の遺伝子を含むDNA断片をプローブとして用いて、Southern hybridization を行った。その結果、YMR26遺伝子は第VIIまたはXV染色体上に、MRP-L33遺伝子は第XIIIまたはXVI染色体上に存在することがわかった。また、同時に genome DNA を *Bam* HI, *Hin* dIII, *Pst* I 切断したものと hybridization を行った結果、これらの遺伝子は single copy であることがわかった。

次に、この二つの遺伝子産物がミトコンドリアにとって必須なものであるかを調べるために遺伝子破壊実験を行った。YMR26遺伝子は *LEU2* 遺伝子を含んだ断片を挿入することにより、また MRP-L33遺伝子は *HIS3* 遺伝子を含んだ断片を挿入することにより破壊し、破壊した遺伝子を含む断片を *LEU*<sup>+</sup>および *HIS*<sup>+</sup>を選択マーカーとして酵母に導入した。その結果得られた組み換え体に破壊した遺伝子が組み込まれていることを Southern hybridization により確認した。このような組み換え体の呼吸能を調べたところ、すべて呼吸欠損の表現型を示すことがわかり、YMR26および YmL33両蛋白質はミトコンドリアの機能に必須であると結論したこのような遺伝子破壊体はミトコンドリアの

DNAに欠失が起こっていることがわかった。この結果はミトコンドリアでの蛋白質合成に必要なものが不活化されるとミトコンドリアが正常にDNAを保持できなくなるということを示唆する。ところで、これまでに他の研究者によって解析されたほとんどのミトコンドリアリボソーム蛋白質はミトコンドリアにとって必須であるが、MRP13とYMR31は遺伝子を破壊してもミトコンドリアの機能に影響を及ぼさない。そこで、二つを同時に破壊した時の呼吸能を調べたところ、ミトコンドリアの機能は正常である事がわかった。したがってこの二種の蛋白質はミトコンドリアの機能には不必要であることになり、それにもかかわらずこれらの蛋白質が存在している事実は何を意味するか等はミトコンドリアリボソームの進化を考える上で興味深い。

酵母は炭素源として glucose を与えると呼吸機能に関与する遺伝子の発現が抑制されること (glucose repression) が知られているので、YMR26および MRP-L33遺伝子の発現がこのような抑制を受けるかどうかを調べた。この目的でこれらの遺伝子の発現を、異なる生育環境においておよび rho<sup>+</sup>株と rho<sup>0</sup>株の間で転写レベルを比較することにより行った。その結果、YMR26・MRP-L33遺伝子の転写は glucose repression を受けるものの rho<sup>0</sup>株ではその程度が低いことがわかった。このことはミトコンドリア DNA の有無が核にある遺伝子の発現に関わっていることを示唆する。次に、ミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子が互いに協調して発現されているかを調べるために、遺伝子のコピー数を大きくしたときの転写量を比べた。実験は YmL8, YmL20, YmL33, YMR26, YMR31およびYMR44蛋白質の遺伝子を multicopy の YEp13につなぎ、それぞれを酵母に導入し、得られた組み換え体からの転写量を比較することによって行った。その結果、これらの遺伝子のコピー数を増すと転写量も増加すること、また、他のミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子のコピー数を増した場合に転写量の増加は見られないことがわかった。したがってこれらの遺伝子の発現には顕著な協調性がないことがわかった。

以上のように本研究では、酵母のミトコンドリアリボソーム蛋白質の二つの遺伝子をクローン化し、それらの遺伝子の全塩基配列を決定し、構造的な特徴を明らかにした。さらに、得られた遺伝子の染色体上の位置、遺伝子破壊の影響、転写レベルでの発現様式など、核とミトコンドリアの間の遺伝的相互作用について解析した。

## 論文審査の結果の要旨

真核細胞は膜によって仕切られたオルガネラを持つことが特徴であるが、このようなオルガネラのうち、ミトコンドリアと葉緑体は核とは別に独自の DNA を持ち、独自の転写・翻訳系を持つことが知られている。しかし、これらのオルガネラの構造と機能に必要な遺伝子の多くは、オルガネラの DNA でなく核の DNA に存在している。したがって核の遺伝子に由来する蛋白質が、オルガネラの遺伝子由来の RNA や蛋白質と複合体を形成するに当たっては、核とオルガネラが協調的に機能することが必要である。オルガネラは原核生物が共生してできたのではないかと考えられており、現在核に存在している遺伝子は、進化の過程でオルガネラから核へ移行したものであるか、あるいは元々

は別の遺伝子であったものが、オルガネラで利用される産物を作るように変化したものであるということになる。

このような考えにたつて学位申請者は、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のミトコンドリアリボソームを対象として本研究を行った。パン酵母のミトコンドリアリボソームは、ミトコンドリア DNA 由来の 2 種類の RNA 分子と 1 種類の蛋白質、および核の遺伝子に由来する数十種類の蛋白質からなり、上述のような点を調べるのに適した対象である。さらに、パン酵母は遺伝的解析が容易であり、これまでに行われてきた多くの遺伝学的解析の蓄積がある。そこで学位申請者は、まず、酵母から分離精製した数種のミトコンドリアリボソーム蛋白質の N 末端部のアミノ酸配列を決定し、対応する遺伝子をクローン化した。

その一つの YMR26 蛋白質の遺伝子のクローンは、そのアミノ酸配列の一部に対応するオリゴヌクレオチドの混合物を合成し、それをプローブとして用いることによって行った。YMR26 遺伝子は 474 塩基対からなっており、その産物は分子量約 18.5 kDa の塩基性蛋白質であり、いわゆるシグナルシーケンスをもたないことがわかった。一方、もう一つの遺伝子 YmL33 蛋白質の遺伝子については、この蛋白質の N 末端部のアミノ酸配列を 40 残基近く決定し、それに基づいて二種類のオリゴヌクレオチドの混合物を合成し、これらを用いて PCR 法による遺伝子部分の増幅を試みることによって行った。得られた PCR 産物を用いることにより、YmL33 蛋白質の遺伝子をクローン化し、さらに、その塩基配列を決定した。YmL33 は 297 塩基対からなる遺伝子によって作られ、YMR26 と同様にシグナルシーケンスをもたないことがわかった。この *MRP-L33* 遺伝子の産物のアミノ酸配列の N 末端側の約 2/3 は大腸菌および *Bacillus stearothermophilus* のリボソーム蛋白質 L30 とかなり高い類似性を示した。また C 末端側の 1/3 については程度は低いが、酵母の細胞質のリボソーム蛋白質 L16 と類似性を示していることがわかった。

次いで学位申請者は、酵母の染色体をパルスフィールド電気泳動法により分離し、YMR26 および YmL33 の遺伝子がどの染色体上に位置しているかを調べた。その結果、YMR26 遺伝子は VII または XV 染色体上に、*MRP-L33* 遺伝子は VIII または XVI 染色体上に存在することがわかった。また、これらの遺伝子は単一コピーであることもわかった。さらに、この二つの遺伝子産物がミトコンドリアにとって必須なものであるかを調べるために、いわゆる遺伝子破壊実験を行った。破壊した遺伝子を含む断片を酵母に導入し、得られた組み換え体の呼吸能を調べたところ、すべて呼吸欠損の表現型を示すことがわかり、YMR26 および YmL33 両蛋白質はミトコンドリアの機能に必須であると結論した。また、このような遺伝子破壊体はミトコンドリアの DNA に欠失が起きていることがわかり、ミトコンドリアでの蛋白質合成に必要なものが不活化されるとミトコンドリアが正常に DNA を保持できなくなるということが示唆された。

酵母はグルコースで呼吸機能に関与する遺伝子の発現が抑制されることが知られているので、YMR26 および *MRP-L33* 遺伝子の発現がこのような抑制を受けるかどうかを調べた。その結果、YMR26・*MRP-L33* 遺伝子の転写はグルコースの影響を受けるものの、 $\rho^0$  株ではその程度が低いことがわかった。このことはミトコンドリア DNA の有無が核にある遺伝子の発現に関わっていること

を示唆する。また、ミトコンドリアリボソーム蛋白質の遺伝子のコピー数を大きくしたときの転写量を比べ、遺伝子の発現の協調性を調べた。その結果、これらの遺伝子の発現には顕著な協調性がないことがわかった。

以上のように本研究では、酵母のミトコンドリアリボソーム蛋白質の二つの遺伝子をクローン化し、それらの遺伝子の全塩基配列を決定し、構造的な特徴を明らかにするとともに、得られた遺伝子の染色体上の位置、遺伝子破壊の影響、転写レベルでの発現様式など、核とミトコンドリアの間の遺伝的相互作用について分子レベルで解析したものであり、その成果は遺伝学・分子生物学の分野に寄与するところが大きい。

したがって、論文提出者 姜媛瓊は学術博士の学位を得る資格があると認める。