

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300112

研究課題名(和文) 酵母ミトコンドリア蛋白質の mRNA 局在化シグナル解析

研究課題名(英文) Mitochondrial targeting signal is major determinant of mitochondrial localizing mRNA

研究代表者

Horton Paul (Horton, Paul)

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノム情報研究センター・研究センター長

研究者番号：00371071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：健康なミトコンドリアを維持する仕組みはまだ部分的にしか分っていない。そこで我々は蛋白質のミトコンドリアへの輸送について研究を行い、その蛋白質の特定部分の進化速度が他の蛋白質より速いことを示し、国際誌(BMC Genomics)にて発表した。また、蛋白質を作る際の鋳型となる mRNA のミトコンドリア周辺への局在について複数の実験データを統合的に統計解析した結果、蛋白質が mRNA から作られる(翻訳開始)速度が遅いほど、その mRNA がミトコンドリアの周辺に局在する傾向にある、という新しい仮説を提案した。この成果はミトコンドリア維持の理解を深め、将来は疾患の有効な治療法につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria dysfunction has been implicated in Alzheimer's and other diseases, but the cellular mechanisms used to maintain mitochondria are only partially understood. Thus we investigated the transport of proteins into the mitochondria and quantitatively showed that a particular region of those proteins evolves faster than other proteins (Fukasawa et al. BMC Genomics 2014). In addition we investigated the localization of mRNA molecules in the vicinity of mitochondria. We did this by integrative statistical analysis of several published datasets. Based on the results of our analysis we propose a novel hypothesis -- that the longer it takes for proteins to be made (translation initiation), the more likely it is that they localize to the periphery of the mitochondria. By providing insights into the mechanisms responsible for maintenance of mitochondrial, in the future our results may contribute to advances in the prevention or treatment of mitochondria related disease.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：mRNA局在 ミトコンドリア mRNA配列解析 タンパク質局在

## 1. 研究開始当初の背景

### ミトコンドリア局在 mRNA

ミトコンドリア蛋白質はアミノ酸やエネルギーの代謝、蛋白質の輸送・分解などの機能を持つほか、アポトーシスにも関与している。ミトコンドリア蛋白質の約 99%は核ゲノムにコードされ、細胞質で翻訳された後、ミトコンドリアに輸送される。その際、アミノ酸配列の N 末端付近に位置する両親媒性ヘリックスがミトコンドリア局在化シグナル(MTS) として機能する事が知られており、配列解析の結果、ミトコンドリア蛋白質の約 40%が MTS を所有すると考えられている (Sickmann et al. ProNAS 2003)。一方、近年、新しい蛋白質のミトコンドリア局在経路として、mRNA がミトコンドリアへ輸送される経路が注目されてきている。一部のミトコンドリア局在 mRNA (MLR) の存在は 30 年以上前から報告されていたが (Kellems & Butow, J. Biol. Chem. 1972)、最近の大規模実験から 100 個以上の MLR が同定された (Marc et al. EMBO Rep 2002)。また、いくつかの MLR において、3' -UTR に MLR の局在化シグナル (MLR-LS) があると報告されておりヒトの 3' -UTR でも酵母で機能する事が実験的に報告されている (Sylvestre et al. Mol. Biol. Cell 2003; Margeot et al., Gene 2005.)。しかし、mRNA のミトコンドリア局在の仕組みを解明するには、以下に示す課題がある。

### 1. ミトコンドリア局在 mRNA の局在化シグナルの多様性

これまでに、4 つのミトコンドリア局在 mRNA の局在化シグナル (MLR-LS) が提案されている。まず、配列モチーフとして CYTGTAATA (Y はプリン塩基) が提案されている (Anderson & Parker, NAR 2000.; Saint-Georges et al., PLoS ONE 2007.)。しかし MLR である ATP2 遺伝子は、この配列モチーフを持たない。さらに、この配列モチーフは mRNA 局在を考慮せず、ミトコンドリア局在蛋白質であるという条件のみから探索しているため、MLR-LS と関連するモチーフではない可能性も含んでいる。実際に、我々が先行的に、高い MLR value を持つミトコンドリア蛋白質に対し配列モチーフ検索を行ったところ、10%もカバー出来ない事が分かった。一方他のグループからは、MLR-LS として 3 種類の 3' -UTR の二次構造モチーフが提案されている。3 種類の内 2 つは ATP2 遺伝子の 3' -UTR を基にした二つの異なる二次構造モチーフである (Margeot et al., Gene 2005.; Lui & Lui, NAR 2007.)。

しかし、APT1 や ATP3 遺伝子はこれらの構造モチーフを持っていない。もう 1 つは、Marc et al. EMBO Rep 2002 のデータセットにある 3' -UTR の二次構造予測を基に得られた二次構造モチーフである (Ejmsont et

al., Acta Biochim. Pol. 2007.)。YJL225C 遺伝子がこの二次構造モチーフと最も良くマッチしたが、ミトコンドリア局在が未確認であるという留意点を残した。以上のようにこれまで全く異なるモチーフが提案されているが、MLR の大半の MLR-LS を説明する事が出来ていない。これは複数種類の MLR-LS が存在する事、未発見の局在化シグナルがある事を示唆しており、mRNA のミトコンドリア局在を解明するためには、新規 MLR-LS の探索が重要である。

### 2. MLR と産物蛋白質の関係

MLR value と産物蛋白質の特徴を調べた先行研究 (Marc et al. EMBO Rep 2002; Karlberg & Andersson Nature Reviews 2003) によれば、MLR value は 1) 蛋白質の疎水性、2) アミノ酸配列 N 末端に予測される MTS の存在、の両方とも相関しないと報告した (Karlberg & Andersson Nature Reviews 2003)。一方、MTS を持つ蛋白質の mRNA がミトコンドリア周辺に局在すると報告がある (Garcia et al., Mol. Biol. Cell, 2007)。このように、相矛盾する結論が得られている。これらの報告がどちらも正しいのであれば、MTS に相関のある MLR グループと相関のない MLR グループの二種類が存在すると考えられる。複数の MLR-LS があることを考慮すれば、未知の局在化シグナルを見つけた上で、共通するシグナル配列を持つグループの産物蛋白質との関係を解析する事で、この相矛盾する結論の解決が期待できる。

### 2. 研究の目的

蛋白質のミトコンドリアへの局在は、一般的に蛋白質レベルでの輸送経路で行われる。しかし、近年の大規模実験により 100 個以上のミトコンドリア局在 mRNA (MLR) が明らかになり、mRNA レベルでの輸送経路がある可能性が示された。mRNA の局在化シグナルとして、これまでに提案されている配列モチーフでは MLR のわずか 10%もカバーできておらず、複数の局在化シグナルが存在すると考えられる。そこで本研究では、mRNA の配列及び構造的特徴に注目した MLR の配列解析と二次構造予測を組み合わせたクラスタリングを行い、新規 MLR 局在化シグナル候補の発見を目的とする。さらに、共通する局在化シグナルを持つ MLR の産物蛋白質の特徴との関連を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、ミトコンドリア局在 mRNA (MLR) の新規局在シグナル (MLR-LS) 候補の探索を行うため、mRNA の一次配列および二次構造的特徴に注目したクラスタリングを行い、二次構造モチーフ群の抽出を行う。さらに、局在化シグナル (MLR-LS) 候補となる得られたモチーフを共有するグループにおいて、RNA

発現量、産物蛋白質発現量、産物蛋白質の特性(ディスオーダー、凝集性)を調べ、mRNAのミトコンドリア局在と産物蛋白質との関連性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

回帰解析により、アミノ酸の配列長の影響を除いても mRNA 局在は MTS と相関すること、また MTS と蛋白質の長さ有意に正相関があることを見つけた。mRNA 配列の 5'UTR、コーディング領域、及び 3'UTR のそれぞれの領域にその存在が mRNA の局在と統計的に有意に相関する新規配列モチーフを多数見つけた。その内 5'UTR 領域に興味深いモチーフとして翻訳開始点の上流 3 塩基にアデニンが mRNA のミトコンドリア周辺局在と統計的に有意に負相関することを突き詰めた。この位置のアデニンが効率的な翻訳を促進することは文献に指摘されているが、mRNA 局在との関係は知られていなかった。以上の解析は現在論文投稿準備中である。また、アミノ酸配列の解析も行い、MTS とアミノ酸配列の進化速度との関係を定量的に調べ、その速度が MTS の予測に有望な特徴量であることを示した。この結果は [Fukasawa et al, BMC Genomics 2014] (責任著者は代表の Horton) にて論文発表を行った。

成果の意義：翻訳効率と mRNA 局在の関係を示唆する 5'UTR モチーフの発見は mRNA 局在への機序を解明する上重要なヒントである。また、より正確な MTS 予測法の開発はミトコンドリアの機能解明に貢献する。

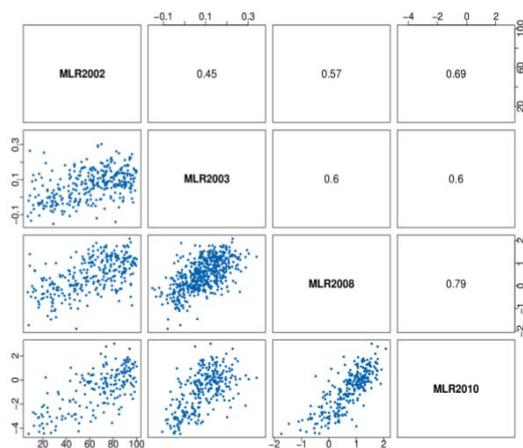
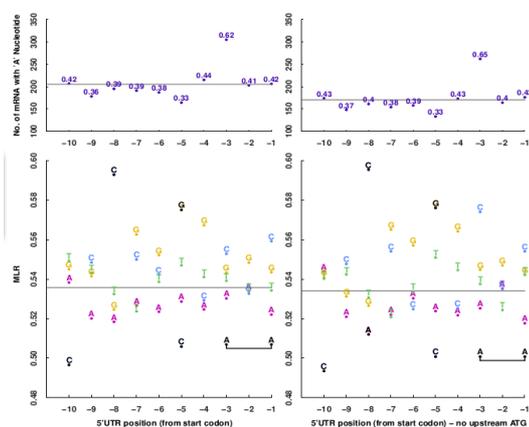


Figure 1: Scatter plots and Pearson correlation values between MLR datasets

図の説明：4つの MLR データセットの相関を示した。



図の説明：縦軸は MLR、横軸は開始コドン基準にした座標。線で示した A-A の組合せを持つ mRNA の MLR は統計的に有意に値が小さい傾向にある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

“Plus ça change - evolutionary sequence divergence predicts protein subcellular localization signals”, Yoshinori Fukasawa, Ross KK Leung, Stephen KW Tsui & Paul Horton, *BMC Genomics*, 15:46, 2014.

〔学会発表〕(計 1 件)

“Mitochondrial targeting signal is major determinant of mitochondrial localizing mRNA”, 崎山 則征, 今井 賢一郎, 富井 健太郎, Horton Paul, 第 34 回日本分子生物学会 2011 年会, パシフィコ横浜, 2011 年 12 月 15 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

ホートン ポール (Horton Paul)  
独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・研究チーム長  
研究者番号：00371071

### (2) 研究分担者

光山 統泰 (Mitsuyama Toutai)  
独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・研究チーム長  
研究者番号：20415673

### (3) 研究分担者

フリス マーティン (Frith Martin)  
独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・主任研究員  
研究者番号：40462832

### (4) 研究分担者

富井 健太郎 (Tomii Kentaro)  
独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・研究チーム長  
研究者番号：40357570

### (4) 研究分担者

今井 賢一郎 (Imai Kenichiro)  
独立行政法人産業技術総合研究所・生命情報工学研究センター・研究員  
研究者番号：80442573