

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440004

研究課題名(和文) 哺乳類ミトコンドリア蛋白質合成系の再構築と分子機構の解明

研究課題名(英文) Reconstitution of mammalian mitochondrial translation system and its application

研究代表者

富田 野乃(竹内野乃)(Tomita-Takeuchi, Nono)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：80323450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類ミトコンドリア蛋白質合成系の分子機構を理解し、薬剤デザイン等の医療応用へ貢献することを目指した。申請者が確立した再構築型哺乳類ミトコンドリアの翻訳システムを応用し、ミトコンドリアにユニークな翻訳終結因子ICT1の機能解析を行った。ICT1の基質特異性や機能部位を解析してその作用機序を明らかにするとともに、ミトコンドリアの変則的終止コドンの解読機構のモデルを提唱した。ミトコンドリアリボソームと翻訳因子の複合体のcryoEM構造解析を進め、PREおよびPOST-トランスロケーション複合体について高分解能の構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：Overall objective of this study is to elucidate the molecular mechanism of translation system in mammalian mitochondria. As a result, we aim to lay the basis for the medical application, such as the design of antibiotics. Utilizing the reconstituted mitochondrial translation system, we have dissected the function of mitochondrial ICT1, a mitoribosomal protein, and yet a member of peptide release factor family. Its substrate specificity as well as the functional domain has been analyzed. We demonstrated the possible engagement of ICT1 in the translation termination at non-standard stop codons AGA and AGG of two mitochondrial ORFs MTCO1 and MTND6, respectively. Structures of the mitoribosomal complexes have been determined by cryoEM reconstruction. The structures of PRE- and POST-translocation complex have been determined at high resolution of approximately 4 angstrom.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：翻訳 ミトコンドリア 生体外タンパク質合成系

1. 研究開始当初の背景

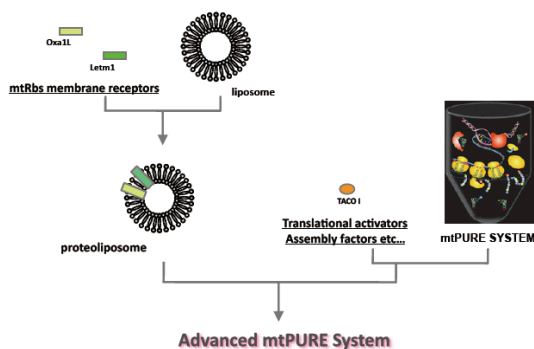
近年、ミトコンドリア翻訳因子の病的変異が相次いで同定されており、またミトコンドリアのリボソームや翻訳因子に誤作用して副作用をもたらす薬剤も報告されている。ミトコンドリア蛋白質合成系の分子機構の詳細やミトコンドリアリボソームの機能構造相関を解明する必要性が高まっている。申請者はこれまで、幾つかのモデル mRNA を翻訳できる生体外ミトコンドリア蛋白質合成系 (mtPURE system) の構築に成功している。本研究ではこのシステムを更に発展させ、哺乳類ミトコンドリア蛋白質合成系の分子機構の詳細について解析してゆくこととした。

2. 研究の目的

(1) 哺乳類ミトコンドリア生体外蛋白質合成系の構築：advanced mtPURE systemの構築

申請者が確立したmtPURE systemを発展させ、mtDNAにコードされたタンパク質を実際に合成することができる哺乳類ミトコンドリア生体外タンパク質合成系(advanced mtPURE system、図1)の構築を目指す。生体におけるミトコンドリアタンパク質合成系は、“ペプチド合成”“ペプチド膜挿入”および“膜タンパク質複合体アセンブリー”の3つのシステムが連携して成り立っている。mtPUREsystemではペプチド合成の過程が再構築されている。そこで、mtPUREsystemにさらに膜挿入とアセンブリーシステムの基本骨格を融合させる。

【図1】ミトコンドリア蛋白質合成系の再構成
～advanced mtPURE systemの構築～



(2) 哺乳類ミトコンドリアリボソームの構造解析

ミトコンドリア 55S リボソームが、各システム (ペプチド合成・ペプチド膜挿入・アセンブリー) のプラットフォームであるという観点から、また 55S リボソームの詳細構造は副作用の少ない新規薬剤の開発に欠かせないという背景をふまえ、55S リボソームの構造解析をクライオ電子顕微鏡観察により進める。

(3) 哺乳類ミトコンドリア翻訳因子に誤作用する薬剤の作用機序の解析：高脂血症治療薬 Statin の RRF2mt/EF-G2mt への作用機序の解析

Statin は高脂血症治療薬として広く利用され、世界で最も売り上げの多い薬剤としても知られる。一方、横紋筋融解症、ミオパシー、肝機能障害、といったミトコンドリア機能異常がうかがわれる副作用を引き起こすことでも知られ、副作用の機序の解明が課題となっていた。最近、申請者が発見した翻訳因子 RRF2mt/EF-G2mt (Tsuboi et al., 2009, Mol. Cell) の SNP 変異細胞株において Statin 感受性が上昇しており、これが副作用の原因となっていると示唆された (PLoS Genet., 2012)。RRF2mt/EF-G2mt SNP 変異体によるリボソーム再生反応が異常をきたしていると推察される。Statin の RRF2mt/EF-G2mt への作用機序を解析する。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類ミトコンドリア生体外蛋白質合成系の構築

以下にのべる①②の方策により、advanced mtPURE system を再構成する。

① mtDNA にコードされた mRNA (natural mRNA) の翻訳系の構築：mtDNA にコードされる全ての mRNA を *in vitro* 転写により調製し、mtPURE system で翻訳を行う。全 13 種類の mRNA のうち翻訳が進まないものについては、mRNA 特異的に翻訳を促進する因子、もしくは翻訳とペプチドの膜挿入・アセンブリーを共役させる因子、などを利用して翻訳を行う必要があると考えられ、以下に述べる準備を進めた。

② ペプチド膜挿入システム・膜タンパク質複合体アセンブリーシステムの再構成：ミトコンドリアリボソームの膜レセプター (Oxa1L, Letm1) の大腸菌発現系を構築し、調製する。またそれらを組み込んだプロテオリポソームを調製する (透析法)。翻訳促進因子(TACO1)について発現系の構築・精製を行う。

(2) 哺乳類ミトコンドリアリボソームの構造解析

申請者自身が調製した 55S リボソームを利用して cryoEM 構造解析を進める。

(3) 哺乳類ミトコンドリア翻訳因子に誤作用する薬剤の作用機序の解析：高脂血症治療薬 Statin の RRF2mt/EF-G2mt への作用機序の解析

Statin 存在下における RRF2mt/EF-G2mt・55S リボソーム相互作用の解析を行う。Statin 感受性が高まる RRF2mt/EF-G2mt SNP 変異体 3 種類 (I627T, E594G, K334R) を調製し、これら変異体の機能解析 (GTPase 活性、リボソーム解離活性) を Statin 存在下・非存在下で行う。

4. 研究成果

(1) 哺乳類ミトコンドリア生体外蛋白質合成系の構築

① mtDNA にコードされる全 13 種類の mRNA を *in vitro* 転写により調製し、mtPURE system で翻訳を行った。4 種の mRNA(ATP8, ATP6, ND4, ND4L)について合成が確認された。合成できなかった残りの mRNA について、ミトコンドリアリボソームの膜レセプター (Oxa1L, Letm1) を組み込んだプロテオリボソームや翻訳促進因子(TACO1)存在下で翻訳を試みたが合成は確認できず、未同定の翻訳促進因子の存在が示唆された。

② mtPURE system の応用として、部位特的に非天然アミノ酸 (光クロスリンカー ε ANB-Lys)を導入する系の開発に取り組んだ。ミトコンドリアリボソームは膜蛋白質の合成に特化したユニークなペプチドトンネル構造を有することが示唆されており、系は新生ペプチドとリボソームトンネルの相互作用の解析などに活用できる。今後クロスリンカーの導入効率を向上させるため、翻訳条件やクロスリンカーの種類について検討を行う。

③ mtPUREsystemを利用してICT1の機能解析を行った。ICT1はミトコンドリアリボソーム蛋白質でありながらペプチド解離因子と相同性をもつユニークな蛋白質である。従来ミトコンドリアの翻訳系の研究では、ミトコンドリアリボソームの調製が困難なため、バクテリアのリボソームを代用して解析が行われてきた。しかし、終止コドンの認識機構をはじめとした翻訳終結のメカニズムは、ミトコンドリアのリボソームを利用しなければ正確に議論することはできず、未解明な課題として残されていた。ICT1のペプチド解離能や基質特異性の解析、および機能部位の同定を行い、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せず、外来からICT1がリボソームに結合することによりペプチド解離活性を示すことを明かにした。さらに、ICT1がミトコンドリアの変則的な終止コドン (AGG, AGA) における終結反応も担っている可能性を示した (Akabane S. *et al.* (2014) *PLoS Genetics*)(Nierhaus K. *et al.* (2015) *PLoS Genetics*)。

(2) 哺乳類ミトコンドリアリボソームの構造解析

cryoEM観察により55Sリボソーム/翻訳因子複合体の構造解析を進めた。PRE-, POST-トランスロケーション複合体について構造決定を完了した (投稿論文準備中)。これまでミトコンドリアリボソーム単体の構造について報告があるが、翻訳因子との機能的複合体としてははじめての構造となる。解像度はおよそ4Åで薬剤デザイン等にも十分応用できる。その他の翻訳因子 (EF-G1mt, EF-G2mt, RRFmt) との複合体についても構造解析を進め、初期構造を得た。

(3) 哺乳類ミトコンドリア翻訳因子に誤作用する薬剤の作用機序の解析：高脂血症治療薬 StatinのRRFmt/EF-G2mtへの作用機序の解析

Statin感受性が高まるRRF2mt SNP変異体3種類(I627T, E594G, K334R)を単離調製し、これら変異体の機能解析 (GTPase活性、リボソーム解離活性)をStatin存在下・非存在下で行った。いずれの変異体においても、GTPase活性やリボソーム解離活性にstatinの影響は観られなかった。この結果は70Sリボソームを解析に利用していることが原因である可能性があり、55Sミトコンドリアリボソームを用いた解析を進める予定である。Statinはリボソームに結合してリボソームを異常に安定化し、変異体によるリボソーム解離を阻害すると推測している。機能解析とともに55S・statin複合体のcryoEM構造解析にも取り組む。

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6件)

- ① Nierhaus, KH. & Takeuchi N. Response to the Formal Letter of Z Chrzanowska-Lightowlers and RN Lightowlers regarding our article "Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria", *PLoS Genet.* (査読有) (2015) 11(6):e1005218. doi:10.1371/journal.pgen.1005218.
- ② Nagano, T., Yutthanasirikul, R., Hihara, Y., Hisabori, T., Kanamori, T., Takeuchi, N., Ueda, T. & Nishiyama, Y. Oxidation of translation factor EF-G transiently retards the translational elongation cycle in *Escherichia coli.*, *J Biochem.* (査読有) (2015) 158(2), 165-72. doi: 10.1093/jb/mvv026.
- ③ Akabane, S., Ueda, T., Nierhaus, KH. & Takeuchi N. Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria, *PLoS Genet.* (査読有) (2014) 10(9):e1004616. doi:10.1371/journal.pgen.1004616.
- ④ Yano, T., Takeuchi, N., Ueda, T. & Haas, RH. Pyrrole-imidazole polyamide, a synthetic DNA-binding compound, is effective at increasing levels of wild-type mtDNA in both cybrid cells and MELAS patient-derived fibroblast cells with the MELAS A3243G mutation by a selective promotion of wild-type replication, *Mitochondrion* (査読有) (2013)13(6), 924-925.
- ⑤ Kotani, T., Akabane, S., Takeyasu, K., Ueda, T. & Takeuchi, N. Human G-proteins, ObgH1 and Mtg1, associate

with the large mitochondrial ribosome subunit and are involved in translation and assembly of respiratory complexes. *Nucleic Acids Res.* (査読有) (2013) 41, 3713-22. doi:10.1093/nar/gkt079.

- ⑥ Hayashi, R., **Takeuchi, N.** & Ueda, T. Nuclear Respiratory Factor 2 β (NRF-2 β) Recruits NRF-2 α to the Nucleus by Binding to Importin- α : β via an Unusual Monopartite-Type Nuclear Localization Signal. *J Mol Biol.* (査読有) (2013) 425, 3536-48. doi: 10.1016/j.jmb.2013.07.007

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① **Takeuchi, N.** Unique translation termination in Mammalian Mitochondria. Molecular Mitochondria : Joint Seminar of Young Finnish-Japanese Mitoscientists. 6th Oct. 2015. Helsinki (Finland). (招待講演)
- ② Hayashi, H., Ueda, T., Ito, K., Kaji, A., **Tomita-Takeuchi, N.** Dissection of non-canonical translational regulation factor Stm1 in Yeast. 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜 (神奈川)
- ③ **Takeuchi, N.** Protein Synthesis System of Mammalian Mitochondria. The 5th meeting of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. 4th Nov. 2013. Seoul (Korea). (招待講演)
- ④ Hayashi, H., Nishimura, S., Kotani, T., Utsunomiya, S., Ishibashi, M., Ueda, T., Ito, K., Kaji, A., **Tomita-Takeuchi, N.** The Regulation of elongation Phase of Translation in Yeast. 2103 Riboclub Annual Meeting. 23th Sept. 2013. Quebec (Canada).

〔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 0 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

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 (竹内) 野乃 (Tomita-Takeuchi, Nono)

東京大学大学院・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号 : 80323450

(2) 研究協力者

赤羽 しおり (Akabane, Shiori)

東京大学大学院・新領域創成科学研究科
博士課程大学院生