



Analysis of the mitochondrial targeting signal of rat serine : pyruvate/alanine: glyoxylate aminotransferase

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伊藤, 浩一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1149

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 296号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏 名	伊 藤 浩 一		
論文題目	Analysis of the mitochondrial targeting signal of rat serine: pyruvate / alanine: glyoxylate aminotransferase (ラット肝セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素のミトコンドリア移行シグナルの解析)		

博士(医学) 伊藤 浩一

論文題目

Analysis of the mitochondrial targeting signal of rat serine: pyruvate/alanine: glyoxylate aminotransferase
(ラット肝セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素のミトコンドリア移行シグナルの解析)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

ラット肝セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素 (SPT、SPT/AGT) は、同一の遺伝子から2種類のmRNAが作られ、そして2種類の翻訳産物が出来る事が知られている。分子量45kDaのミトコンドリア型前駆体は、ミトコンドリアへと移行し、そこで22アミノ酸からなるミトコンドリア移行シグナル部分 (MTS) が切り離されて成熟型酵素となる。一方、分子量43kDaのペルオキシソーム型酵素はペルオキシソームへと移行し、そのままの形で機能する。細胞内局在が異なる両者の間には、酵素的、物理化学的、免疫化学的性質に差異は認められない。ミトコンドリア型前駆体はアミノ末端にMTS、カルボキシル末端にはペルオキシソーム移行シグナル (PTS) を同時に持つにもかかわらず、ミトコンドリアのみへと移行する。MTSとPTSが共存すると、PTSの機能が抑制されると考えた。そこで、MTSに様々な変異を加えた部位特異的変異体を作製し、COS-1細胞で発現させる事によって、MTSの機能を詳細に解析した。

〔材料ならびに方法〕

MTS部分にアミノ酸の置換や様々な長さの欠失を加えたSPTの部位特異的変異体を作製し、COS-1細胞で発現させて変異蛋白の細胞内局在を見る事で、MTSの変異がミトコンドリア移行機能とペルオキシソーム移行機能に与える影響を検討した。変異蛋白の細胞内局在の同定方法としては、免疫ペルオキシダーゼ染色による光学顕微鏡での検出と、細胞分画により得られた画分の蛋白プロットを用いたが、変異蛋白の種類によっては、細胞内局在の同定が困難な場合があったので、新しい手法として多重免疫蛍光染色法を用いた。これは、ミトコンドリアとペルオキシソームの標識酵素と変異SPTをそれぞれ別の蛍光色素で標識し、同時に発色させる事で変異SPT蛋白の細胞内局在がより明瞭に決定できる方法である。

〔結果〕

SPTのMTSに1アミノ酸の置換を加えたものでは、蛋白のミトコンドリアへの移行に影響は見られなかった。2つのアミノ酸を同時にプロリンに置換したもののでも、ミトコンドリアへの移行は阻害されなかったが、3つのアミノ酸を同時にプロリンに置換したものは、ミトコンドリアへの移行機能を失った。欠失変異に関しては、アミノ末端、カルボキシル末端のどちらからの欠失でも、少ないアミノ酸の欠失ではミトコンドリア移行機能は失われなかったが、アミノ酸5個以上の欠失変異体では、ミトコンドリア移行機能が阻害され、一部ペルオキシソームへと移行するものも見られた。しかし、MTSの中央3分の1を欠失した変異体では、ミトコンドリア移行機能は失われなかった。

〔考察〕

1 アミノ酸の置換や少ないアミノ酸数の欠失変異体は、SPTのミトコンドリア移行機能を失わなかったことから、MTSの機能の発揮のためにはMTS全体の構造が重要である事が示唆された。しかし、MTSの中央3分の1を欠失した変異体はミトコンドリア移行機能を失わなかったため、この部分はMTSの機能を発揮する上で重要でない事が考えられる。蛋白分解酵素に対する、ミトコンドリア型前駆体とペルオキシソーム型酵素の感受性が異なる事実からも、MTSがSPTの分子の2次構造を変化させる事でPTSの抑制が引き起こされている可能性が考えられる。従来よく用いられてきたペルオキシダーゼ染色による変異SPTの細胞内局在の決定は、過剰発現した産物が細胞質に留まっていると細胞内小器官の局在の検定が困難な場合がある。今回導入した、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、SPTの3者をそれぞれ別の蛍光色素で標識し、SPTが細胞内小器官に移行した場合に発色に変化する性質を利用した多重染色法は、特に複数の細胞内区画に産物が局在する場合の、細胞内局在の決定に有効である事が示された。しかし、変異蛋白が不安定で培養中に分解してしまうような場合には検定が困難なため、試験管内でのSPTのミトコンドリア、ペルオキシソームへの取り込み実験を進行中である。

論文審査の結果の要旨

ラット肝セリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素（SPT、SPT/AGT）は、同一の遺伝子から転写開始点の違いにより2種類のmRNAが作られるため、2種類の翻訳産物が存在する。すなわち、分子量45kDaのミトコンドリア型前駆体と分子量43kDaのペルオキシソーム型である。これらの違いは、前者がアミノ末端に22アミノ酸からなるミトコンドリア移行シグナル（MTS）を持ち、後者はこれを持たないことにある。この違いが、両分子のミトコンドリアおよびペルオキシソームへの特異的移行を可能にしている。しかし、ここで疑問に遭遇する。すなわち、ミトコンドリア型前駆体はアミノ末端にMTS、カルボキシル末端にはペルオキシソーム移行シグナル（PTS）を同時に持つにもかかわらず、何故ミトコンドリアのみに移行するかということである。

そこで、申請者はMTSがPTSの機能を抑制するのではないかとの作業仮説の下、MTSに様々な変異を加えた変異体を作製し、COS-1細胞に発現させ、SPTの細胞内局在に与える影響を検討した。MTSは両親媒性の α -ヘリックス構造をとっていると考えられるので、その構造に必要と考えられる塩基性アミノ酸の置換や様々な長さの欠失を加えた変異体を作製した。変異SPT蛋白の細胞内局在の同定方法としては、細胞分画により得られた画分の蛋白プロットと、免疫ペルオキシダーゼ染色による光学顕微鏡での検出を用いた。また、変異SPT蛋白によっては細胞内局在の同定が困難な場合があったので、新しい手法として多重免疫蛍光染色法を用いた。すなわち、ミトコンドリアとペルオキシソームの標識酵素と変異SPT蛋白をそれぞれ別の蛍光色素で標識し、同時に発色させることで変異SPT蛋白の細胞内局在を明瞭に決定した。これにより、過剰発現したSPTが細胞質にバックグラウンドとなった状態でも、細胞内小器官への移行が検出可能となった。

その結果、以下の事実が判明した。(1) SPTのMTSの機能は1アミノ酸の置換では失われなかった。(2) プロリンへの置換では、3アミノ酸を同時に置換した場合にのみMTSの機能が阻害された。(3) 欠失変異に関しては、5残基以上の大きなアミノ酸の欠失でMTSの機能が阻害され、一部ペルオキシソームに移行するものも認められた。しかし、(4) MTSの中央3分の1を欠失した変異体（両親媒性の構造を保持していると考えられる）でもミトコンドリア移行機能は失われなかった。

以上の結果より、申請者は、SPTのMTS機能は数アミノ酸の特定の配列によるドメインとして機能

しているのではなく、22アミノ酸全体の構造でミトコンドリアへの標的機能を担っていることを示した。また、MTSがSPTの分子の高次構造を変化させることでPTS機能を抑制している可能性を提唱した。

審査委員会では、MTSの機能を多種の変異体を作ることにより詳細に解析した点、さらに、この解析に多重免疫蛍光染色法を用い、これまで困難を伴った変異SPT分子の局在を明確にした点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) COS-1細胞をこの研究で使った理由は
- 2) 遺伝子導入法としてリン酸カルシウム沈殿法を使った根拠は
- 3) 発現ベクターとして何を用いたか
- 4) transientの発現型を使った理由
- 5) プロリンへの置換を行った残基の決定理由は
- 6) 光顕でミトコンドリアと同定した根拠は
- 7) 変異体遺伝子産物がサイトゾルに多く認められる理由は
- 8) MTSの変異がSPTを不安定にさせる理由は
- 9) 多重免疫蛍光染色による細胞内局在決定の妥当性は
- 10) MTS変異体とmitochondrial import stimulating factor (MSF) の結合能を検討したか
- 11) Mito Trackerの特異性と発色機序について
- 12) 蛍光染色における発色量の違いは何を意味するか
- 13) MTSがSPTのペルオキシソームへの移行を抑制する機序について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 小 出 幸 夫

副査 教授 藤 田 道 也 副査 助教授 鮫 島 道 和