



Fidelity of Translation Initiation of mRNA for the Precursor of Rat Mitochondrial 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: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 船井, 恒嘉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1500

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	医博論第 223号	学位授与年月日	平成 7年11月17日
氏 名	船 井 恒 嘉		
論文題目	Fidelity of Translation Initiation of mRNA for the Precursor of Rat Mitochondrial Serine: Pyruvate / Alanine: Glyoxylate Aminotransferase (ラットミトコンドリアセリン：ビルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素前駆体 mRNA の翻訳開始の忠実性)		

博士(医学) 船 井 恒 嘉

論文題目

Fidelity of Translation Initiation of mRNA for the Precursor of Rat Mitochondrial Serine:Pyruvate/Alanine:Glyoxylate Aminotransferase

(ラットミトコンドリアセリン：ピルビン酸／アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素前駆体 mRNA の翻訳開始の忠実性)

論文の内容の要旨

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/AGT) は、ミトコンドリアとペルオキシゾームの両オルガネラに存在する。SPT/AGT 遺伝子は単一であるが、2ヶ所の開始部位からの転写のため 5' 端の長さが異なる 2 種類の SPT/AGT mRNA が合成される (Oda, T., Funai, T., and Ichiyama, A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 7513-7519)。長い mRNA の翻訳では、N 末端にミトコンドリア移行配列をもつミトコンドリア SPT/AGT の 45 kDa 前駆体 (pSPT/AGTm) が合成される。この前駆体はミトコンドリアへ移行後プロセッシングを受けて 43 kDa の成熟酵素 (SPT/AGTm) になる。ペルオキシゾーム SPT/AGT (SPT/AGTp) は短い mRNA からの翻訳により成熟型 43 kDa として合成され、分子内のまだ同定されていないペルオキシゾーム移行配列によりペルオキシゾームへ移行する。43 kDa と 45 kDa の SPT/AGT をコードする cDNA を COS 細胞に導入し、一過性に発現させて SPT/AGT の局在を免疫組織化学的に検出する実験によりこれらの結果は確かめられた (Yokota, S., Funai, T., and Ichiyama, A. (1991) *Biomed. Res.* 12, 53-59)。しかし、45 kDa SPT/AGT をコードする cDNA を COS 細胞に発現させた時、SPT/AGT の大部分はミトコンドリア内に局在したが、ごく一部ではあるがペルオキシゾーム内にも局在した。Kozak の leaky scanning 仮説を適用すると、pSPT/AGTm mRNA の最初の AUG コドンは、その前後の塩基配列が翻訳開始を指示するものとして至適ではないために、一部の 40S リボソームサブユニットはこの AUG を通過してその下流にある 2 番目の AUG に達するが、これも至適な塩基配列でないのでさらに通過し、3 番目の AUG コドンまで進んで翻訳が開始されることにより 43 kDa SPT/AGT が合成されると推定される。この研究では、ウサギ網状赤血球ライセート *in vitro* 翻訳系を用いて、43 kDa SPT/AGT が leaky scanning により 45 kDa SPT/AGT をコードする mRNA から合成されることを明らかにした。最初の AUG の周囲の塩基配列を至適な配列に変異させた cDNA から *in vitro* 転写翻訳反応を行うと、leaky scanning による 43 kDa SPT/AGT の合成量は著しく減少した。一方、変異により AUG の周囲の塩基配列をさらに弱めたところ leaky scanning は増加したが、依然として 45 kDa SPT/AGT の合成量は 43 kDa SPT/AGT より優位であった。Kozak は、mRNA の翻訳開始点の近くにある stem-loop 二次構造が 40S リボソームサブユニットの leaky scanning を抑制することで、至適な配列にない AUG コドンの認識を高めて翻訳開始を容易にし得ると提唱した。SPT/AGT の場合にもこれがあてはまるかどうか検討した。最初の AUG コドンの認識に対する影響を検討するために、pSPT/AGTm mRNA の二次構造を解析したところ、+10 ~ +29 (pSPT/AGTm mRNA の最初の AUG の A を +1 とする) の位置に ΔG が -12.40 kcal/mol の stem-loop 構造が予測された。これは pSPT/AGTm mRNA の翻訳において、至適配列を持たない最初の AUG コドンの認識をその下流にある stem-loop 構造が強めていることを示唆した。ヒト SPT/AGT とラット SPT/AGT の mRNA の塩基配列は翻訳領域において相天性が高いが、非翻訳領

域では相同性が低い。ヒト SPT/AGT mRNA では、ラットの最初の AUG コドンは AUA に変異している。AUA を AUG に変異させて *in vitro* 翻訳を行うと 43 kDa SPT/AGT 合成量は 45 kDa SPT/AGT より多かった。ヒト SPT/AGT mRNA の変異された AUG コドンの下流にはラットにある stem-loop 構造が存在しないという RNA の二次構造予測の結果とこの *in vitro* 翻訳実験の結果は一致した。しかし、下流の RNA のこの二次構造の存在にもかかわらず、ラット pSPT/AGTm mRNA の *in vitro* 翻訳反応では leaky scanning は約 20% に及んだ。これは stem-loop 構造と最初の AUG コドンの距離が最大効果がみられる 14 塩基よりも短い 9 塩基しかないこと、および stem-loop 構造の自由エネルギーが十分高くはないことが原因と推察された。ミトコンドリアとペルオキシゾームの SPT/AGT は異なる細胞機能に関与すると推定される。ラット肝細胞、さらにはほとんどの SPT/AGT をミトコンドリアに持つ肉食動物の肝細胞において、ペルオキシゾーム SPT/AGT がミトコンドリア SPT/AGT mRNA から leaky scanning によりどの程度合成されているのか解明されるべき問題である。

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/AGT) は、ミトコンドリアとペルオキシゾームの両オルガネラに存在する。SPT/AGT 遺伝子は単一であるが、2ヶ所の開始部位からの転写のため 5' 端の長さが異なる 2 種類の SPT/AGT mRNA が合成される。長い mRNA の翻訳では、N 末端にミトコンドリア移行配列をもつミトコンドリア SPT/AGT の 45 kDa 前駆体 (pSPT/AGTm) が合成される。この前駆体はミトコンドリアへ移行後プロセッシングを受けて 43 kDa の成熟酵素 (SPT/AGTm) になる。ペルオキシゾーム SPT/AGT (SPT/AGTp) は短い mRNA からの翻訳により成熟型 43 kDa として合成され、ペルオキシゾームへ移行する。43 kDa の SPT/AGT をコードする cDNA を COS 細胞に導入し、一過性に発現させると SPT/AGT はペルオキシゾームのみに局在した。45 kDa SPT/AGT をコードする cDNA を COS 細胞に発現させると、SPT/AGT の大部分はミトコンドリア内に局在したが、ごく一部ではあるがペルオキシゾーム内にも局在した。

申請者はウサギ網状赤血球ライセート *in vitro* 翻訳系を用いて、pSPT/AGTm mRNA の翻訳開始の忠実性を検討し、以下のことを明らかにした。

(1) 40S リボゾームサブユニットの leaky scanning (Kozak) により、43 kDa の SPT/AGT が 45 kDa SPT/AGT をコードする mRNA から合成された。その合成量は 45 kDa SPT/AGT の 20% に及んだ。

(2) pSPT/AGTm mRNA の最初の AUG コドンに関しては、その前後の塩基配列が翻訳開始を指示するものとして至適ではない。そこで最初の AUG の周囲の塩基配列を至適な配列に変異させた cDNA から *in vitro* 転写翻訳反応を行うと、leaky scanning による 43 kDa SPT/AGT の合成量は著しく減少した。一方、変異により AUG の周囲の塩基配列をさらに弱めたところ leaky scanning は増加したが、依然として 45 kDa SPT/AGT の合成量は 43 kDa の SPT/AGT より優位であった。

(3) pSPT/AGTm mRNA の最初の AUG の A を +1 とすると +10~+29 の位置に $\Delta G = -12.40$ kcal/mol の stem-loop 構造が RNA の二次構造の解析により予測された。非翻訳領域に stem-loop 構造がないとヒト SPT/AGT mRNA の *in vitro* 翻訳実験を行い、ラットと比較することにより、ラット pSPT/AGTm mRNA の翻訳において、至適配列を持たない最初の AUG コドンの認識はそ

の下流にある stem-loop 構造によって強められているであろうことが示唆された。

以上のことは stem-loop の RNA 二次構造がラット pSPT/AGT_m mRNA の翻訳の開始を確実に進めることを発見したことで評価に値するとされた。

審査の課程において、次のような質疑がなされた。

- 1) 試験管内と細胞を用いた実験系で43 kDa と45 kDa SPT/AGT はどんな割合で合成されるか
- 2) ラットの pSPT/AGT_m mRNA には AUA 配列はあるのか
- 3) 45 kDa SPT/AGT でありながらミトコンドリアとペルオキシゾームに入っていくというシグナルは何によって決まるのか
- 4) ヒト異常43 kDa SPT/AGT はミトコンドリアのみに入るが、構造に特徴があるのか
- 5) COS 細胞に SPT/AGT 遺伝子を導入した後は細胞の形態は変わるのか
- 6) 細胞の状態を薬剤等で変えてやるとミトコンドリア又はペルオキシゾームへ行く方向が変わるのか
- 7) ペルオキシゾーム増殖剤を与えるとミトコンドリアはどうなるか
- 8) SPT/AGT をミトコンドリアマトリクスに運ぶさいのシャペロンは何か、色々あるのか
- 9) 遺伝子導入実験に COS 細胞以外の各種細胞を用いた場合、この現象は異なるか

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

論文審査担当者 主査 教授 吉 田 孝 人

副査 教授 藤 田 道 也 副査 教授 村 上 彰

副査 助教授 小 出 幸 夫 副査 助教授 梶 村 春 彦