

論文内容要旨

報告 番号	甲 創 第 13 号	氏 名	山越 亮平
学位論文題目	哺乳類のミトコンドリアの輸送体を酵母に機能発現させるために必要な因子の理解に向けて		
<p>内容要旨</p> <p>ミトコンドリアは、エネルギー産生を担う細胞内小器官であり、外膜と内膜からなる二重膜構造を有している。外膜には電位依存性アニオンチャネルが発現しており、ほとんどのイオンや溶質を非選択的に透過させる。一方、内膜を介した H^+ の電気化学ポテンシャル差が ATP 合成の駆動力として用いられているため、内膜の透過性は極めて低く保たれている。しかし、ミトコンドリアのマトリックスに多くの分子種やイオンを送達させる必要があり、ミトコンドリア内膜にはそれぞれの分子に選択的な輸送体が発現していることが知られている。これらの輸送体の構造と機能を理解するためには、ミトコンドリアを有しつつ、ゲノム改変が容易な酵母の発現系の利用が効果的である。本研究では哺乳類のミトコンドリアの輸送体を酵母に機能発現させることを試みた。対象とした輸送体は Ca^{2+} ユニポーターとリン酸輸送体である。</p> <p>酵母のミトコンドリアには Ca^{2+} ユニポーターは発現していないため、野生型酵母に哺乳類のミトコンドリアの Ca^{2+} ユニポーターを発現させることを試みた。Ca^{2+} ユニポーターは複数のポリペプチドで構成される輸送体であり、mitochondrial calcium uniporter (MCU) と essential MCU regulator (EMRE) の 2 つのタンパク質が機能発現に重要であると考えられているため、これらのタンパク質の発現ベクターを酵母に導入した。その結果、EMRE は発現ベクターを導入するだけで酵母に発現させることができたが、MCU は発現しなかった。発現条件を細かく検討した結果、MCU を酵母に発現させるためには、その N 末領域のコドンの最適化が必要だった。MCU のコドンの最適化を行うことで、両タンパク質を酵母に発現させることができ、Ca^{2+} ユニポーターを酵母のミトコンドリアに機能的に発現させることができた。</p> <p>次に、哺乳類のミトコンドリアのリン酸輸送担体を酵母に機能的に発現させることを試みた。酵母のミトコンドリアのリン酸輸送体遺伝子を破壊した株 (ΔPIC) を調製し、ここに哺乳類のリン酸輸送体の発現ベクターを導入した。哺乳類のリン酸輸送体の N 末には酵母のリン酸輸送体では見られないプレ配列が存在していたため、哺乳類の完全長のリン酸輸送体 (PIC) とプレ配列を削った輸送体 ($\Delta NPIC$) の発現ベクターを導入したところ、完全長のリン酸輸送体は発現せず、プレ配列を削った輸送体はミトコンドリアに発現することが明らかになった。しかし、このようにして発現させることができた輸送体はリン酸輸送活性を示さなかったため、これに無作為に変異を導入し、リン酸輸送活性を示す変異株の獲得を試みた。その結果、膜貫通領域中の特定のアミノ酸残基の点変異によって哺乳類のリン酸輸送体を酵母において機能的に発現させることに成功した。</p> <p>本研究によって、哺乳類のミトコンドリアを酵母で機能的に発現させるためには、コドンの最適化やプレ配列の除去、あるいは点変異の導入が有効であることを明らかにすることができた。</p>			