



研究ノート

蛋白質の細胞内配置を決定するシグナルについて

長谷俊治* 松原央**

1. はじめに

生物体の構成単位である細胞の内部には、細胞小器官と呼ばれる構造的、機能的に分化した各種の微細区画が存在し、各々の部分が細胞全体の生命活動の中の一部を担っている。代表的な例として、呼吸や光合成によるエネルギー產生の場であるミトコンドリアや葉緑体、遺伝子の複製や発現の場である核などがある。細胞小器官はそれ自身の機能と関連した多くの種類の蛋白質（酵素）を含んでいるが、これらの大部分のものは細胞小器官内で合成されるのではなく、その外側の細胞質で合成されている。したがって、これらの蛋白質は合成の場である細胞質から機能する場である所定の細胞小器官へ移動し、そこに局在化しているわけである。そして、この動きは方向性のある、いわば能動的なものとして理解されており、これを調節する何らかのシグナルが蛋白質自身の中に含まれていると考えられる。われわれは、このしくみを明らかにすることを目指して、ミトコンドリア蛋白質の局在化に関する蛋白質の構造の解明を試みており、その概略を以下に述べる。

2. 遺伝子操作を利用した変異蛋白質の作製

研究材料とする蛋白質は、酵母のミトコンドリアに局在している分子量7万の蛋白質（70kと略）である。ミトコンドリアは内膜と外膜の2重膜に囲まれた細胞小器官で、70kは分子の極く一部（10%以下）で外膜に強く結合し、残りの大部分は細胞質側に露出したような姿で存

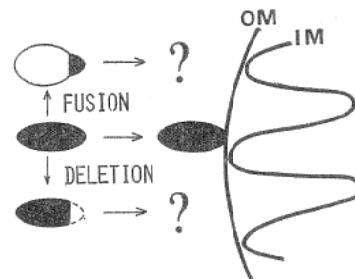


図1 70Kのミトコンドリア外膜局在化を調べる実験方法。元の70K（黒くぬりつぶしたもの）は外膜（OM）に移行する。この蛋白質の一部を欠させたり、他の蛋白質に融合させたものについて、その挙動を調べる。

在している。この蛋白質の遺伝子をクローニングしてDNAの構造決定を行い、アミノ酸配列順序を推定した。この70kのミトコンドリア外膜局在化に必要なシグナルが蛋白質自身の中にあるのか、あれば分子のどの部分なのかを調べるために図1に示すような実験を計画した。まず、分子の一部を欠いた欠失蛋白質を作り、この細胞内での挙動を追跡する。もし欠失部分が局在化に不要な部分であれば、その欠失蛋白質はミトコンドリア外膜に局在化する能力を保持しているであろう。逆に、必要な場合はその能力を失っているはずである。次に70kの分子の一部分を他の非ミトコンドリア蛋白質に融合させたハイブリッド蛋白質を作る。局在化に必要な部分を融合させた場合には、このハイブリッド蛋白質はミトコンドリアへ移行する能力を新たに獲得することが予想される。このような検定法を用いることにより、70kのシグナルを見いだせるものと期待して研究を進めた。従来の蛋白質化学の手法で欠失蛋白質や融合蛋白質を作るのは困難があるので、クローニングした遺伝子を操作して、それぞれの変異蛋白質に対応する遺伝子を作り、それを酵母細胞内で発現させる新しい手法を適用した。

*長谷俊治 (Toshiharu HASE) 大阪大学理学部、生物学科、助手、理学博士、生物化学

**松原 央 (Hiroshi MATSUBARA), 大阪大学理学部、生物学科、教授、理学博士、生物化学

3. 欠失蛋白質のミトコンドリア局在化能

70 k のポリペプチド鎖は 617 残基の アミノ酸より成る。表 1 に示すように、この分子全体の種々の位置に欠失が生じた蛋白質を遺伝子修飾法で作った。各々の欠失蛋白質を合成している酵母を細胞分画し、膜成分としてミトコンドリアと小胞体 (Microsome) を、可溶性画分として細胞質基質 (Cytosol) を調製した。元の 70 k は当然、大部分ミトコンドリア画分に認められ

表1 70Kの欠失蛋白質の細胞内分布. 欠失部分のアミノ酸残基の位置を△で示す

Polypeptides	Distribution of polypeptide (%)		
	Mitochondria	Microsomes	Cytosol
.70kDa	88	2	10
Δ415-617	90	4	6
Δ108-403	95	2	3
Δ49-203	75	6	15
Δ42-203	76	6	18
Δ23-174	2	1	98
Δ15-157	10	1	90
Δ13-179	9	1	91
Δ12-106	29	7	64
Δ1-185	4	2	94
Δ1-205	2	1	98

るが、この局在化の能力はポリペプチド鎖の42番目からC末端（617番）までの間に欠失部がある分子種については依然として保持されており、したがって42番目以下の部分はミトコンドリア局在化には関与していないと結論した。一方、分子の23番目よりN末端側から欠失が始まる分子種では、ミトコンドリア局在化能は著しく減少、もしくは消失しており、先の結果と考え合わせると、42番目よりN末端側に70kの局在化のためのシグナルが含まれていると推定できる。図2に70kのN末端より50残基のアミノ酸配列順序を示す。この蛋白質は全体としては酸性蛋白質であるが、最初の46残基までにはプラス荷電を持つアミノ酸のみが存在し、この領域

域が局部的に塩基性に富むものと予測される。また、非常に特徴的な構造として10番目から37番目までに非解離性のアミノ酸が28番残基連続し、この両側が先述の塩基性アミノ酸で囲まれていることがあげられる。この構造は一般の蛋白質の膜結合部とよく対応し、70 k の場合もこの部分でミトコンドリア外膜に結合しているものと推察される。さらに重要な事は、このN末端部は単なる膜結合部にとどまらず、ミトコンドリア外膜と他の生体膜とを識別できる能力を備えたシグナルとして働いていることである。この事を確認するため以下の実験を行った。

4. 非ミトコンドリア蛋白質への ミトコンドリア局在能の付与

欠失蛋白質の挙動解析より、70kのN末端部がこの蛋白質のミトコンドリア局在化のためのシグナルであると推定したが、このシグナル部分を他の非ミトコンドリア蛋白質に導入することにより、人為的にこの蛋白質をミトコンドリアに局在化させることができると考えられる。大腸菌の β -ガラクトシダーゼという乳糖を加水分解する酵素を用いて実験を行った。遺伝子操作の技術を利用して、この酵素のN末端に70kのシグナル部分を連結した融合蛋白質を作製した。酵母自身は β -ガラクトシダーゼの酵素活性を持たず、融合蛋白質を細胞内で発現させるよう操作した酵母のみがこの活性を示す。図3に示すように、70k由来のポリペプチド鎖の長さが異なる4種類の融合蛋白質（A～D）の酵母細胞内での分布を調べた。A～Cの61残基以上の長さのものを結合させたものは、酵素活性の大部分がミトコンドリア画分に存在した。一方、Dの21残基を結合させたものは、活性の大部分が細胞質基質にとどまっており、ミトコンドリア局在化のシグナルとして、この21残基

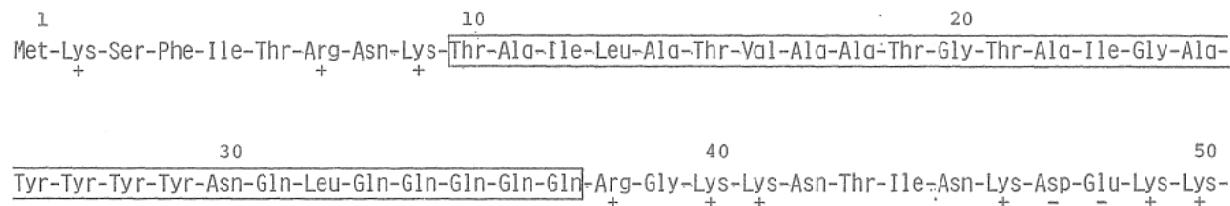


図2 70KのN末端部50残基のアミノ酸配列順序

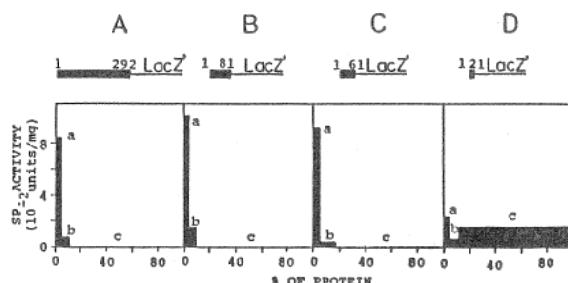


図3 70K と β -ガラクトシダーゼ (LacZ') の融合蛋白質の細胞内分布。a, b, c は各々、ミトコンドリア、小胞体、細胞質基質画分を示す。

だけでは不備であることがわかる。これらの結果から、70kのN末端部21残基以上、そして、長くても61残基までの部分に β -ガラクトシダーゼをミトコンドリアに局在化させ得るすべて

の情報が含まれていると結論できる。これは先の欠失蛋白質を使った実験より導いた結論と良く一致している。

5. おわりに

蛋白質の細胞内局在化を決定している情報が、その蛋白質分子全体としての性質によるものでなく、分子の極く限られた部分、70kの場合にはN末端側41残基内に存在するペプチド構造がシグナルとして働いている事が明らかとなつた。このような現象は、他の蛋白質についても、しだいに明らかになりつつあり、細胞内の高度に制御された物質代謝や刺激反応の場を作り上げている蛋白質の秩序ある配置の調節機構が統一的に理解できる日が近いと期待される。

