

# 哺乳類ミトコンドリアにおける新規翻訳因子の発見

竹内野乃(富田野乃), 上田卓也

翻訳伸長因子 G (EF-G) は、タンパク質合成における『トランスロケーション反応』と『リボソーム解離反応』を兼担するユニークな翻訳因子である。今回、哺乳類ミトコンドリアにおいては異なる EF-G ホモログ (EF-G1mt 及び EF-G2mt) がトランスロケーション反応とリボソーム解離反応を分担していることが明らかになった。EF-G2mt は、翻訳伸長過程には関与せずリボソーム解離反応のみを担う新規な翻訳因子であり、名称を RRF2mt (ミトコンドリアリボソーム再生因子 2) と改めることを提唱した。RRF2mt の発見は、タンパク質合成系における中心的な翻訳因子の役割についての常識を覆すもので、これまでの教科書の記述も修正が必要になる。翻訳因子 (特にリボソーム依存 GTPase) の作用機序や機能構造の研究に大きな影響を与えるとともに、タンパク質合成系の進化についても新しい視点を提供した。

## はじめに

近年、ミトコンドリアのタンパク質合成が様々な病気や老化、また薬剤による副作用に関係していることが明らかにされており、ミトコンドリアタンパク質合成系のメカニズムの全容を詳しく解明してゆくことが医療応用の観点から益々重要になっている。本稿では、哺乳類ミトコンドリアのタンパク質合成系の研究に関する最近の知見を簡単に概説した上で、筆者らが最近見いだした新規な翻訳因子 EF-G2<sub>mt</sub>/RRF2<sub>mt</sub> を紹介したい。

### 1. 哺乳類ミトコンドリアタンパク質合成系とヒト疾患

#### 1.1 哺乳類ミトコンドリアのタンパク質合成系

ミトコンドリアは真核生物において酸化的リン酸化により ATP を合成するオルガネラである。エネルギー生産の

他に、細胞分化やアポトーシスの制御にも関与している。ミトコンドリアは核とは別に独自の DNA (mtDNA) をもつ。哺乳類では mtDNA はおよそ 16k 塩基対で、二つのリボソーム RNA (12S rRNA, 16S rRNA) のほか、22 個の tRNA の遺伝子を含み、そのほか 13 の構造遺伝子を含んでいる。ミトコンドリアの内・外膜やその間隙の特定の部位には、呼吸や ATP の生成などの反応に関わる酵素を含めて数百種におよぶタンパク質が存在するが、これらのタンパク質のうち mtDNA にコードされる上述の 13 種がミトコンドリアのタンパク質合成系で翻訳される。核の DNA にコードされているものは、細胞質で合成されたのちミトコンドリアに輸送される。哺乳類ミトコンドリアで翻訳されるタンパク質はすべて、呼吸鎖酵素複合体のサブユニットと ATP 合成酵素のサブユニットであり、細胞質から輸送されたタンパク質と複合体を形成してはじめて機能を果たすようになる。

#### 1.2 ミトコンドリア病

ミトコンドリアの機能異常によって起きるヒトの病気の総称が「ミトコンドリア病」である。ミトコンドリアは、成熟赤血球以外の全ての細胞に存在しており、さらにエネルギー生産以外にもアポトーシスや細胞分化にも関与して多機能であるから、およそあらゆる症状と関連しているといつてよい。最近ではミトコンドリアの機能異常が複合的原因の一つであってもミトコンドリア病とよぶことも多く

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 (〒277-8562 柏市柏の葉 5-1-5 東大新領域生命棟 401)

EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis

Nono Takeuchi (Nono Tomita) and Takuya Ueda (Department of Medical Genome Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Building FSB-401, 5-1-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba Prefecture 277-8562, Japan)

なっており、ミトコンドリア病の概念が拡張している。日本では、3大病型（外眼筋麻痺を特徴とする CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia), 筋肉の痙攣（ミオクローヌステんかん）を特徴とする MERFF (myoclonic epilepsy associated with ragged-red fibres), 脳卒中様症状が特徴の MELAS (mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes)) に属するミトコンドリア病の患者数は数百人とみられているが、上記のように糖尿病患者（全国で 600 万人）のうちおよそ 1% はミトコンドリアの異常によるといわれており、これを含めると患者数は数万人に達すると見積もられている。遺伝子病の中ではもっとも患者数が多い。

ミトコンドリア病は、核ゲノムにコードされている遺伝子の変異にも起因するが、mtDNA の変異に由来することが多い。mtDNA の病的変異は 90 以上の再編成と 180 以上の点変異が報告されている (<http://www.mitomap.org/>)。中でも、ミトコンドリア tRNA の変異が多くみつかっており、現在分かっている病的変異の半分以上を占める。近年、ミトコンドリア tRNA に加えてミトコンドリアリボソームやミトコンドリア翻訳因子の病的変異が次々とみつかっている (表 1)。ミトコンドリアの翻訳因子の異常は主にミトコンドリア脳筋症と関連しており、また、パーキンソン病や遺伝性痙攣性対麻痺などのヒト脳疾患にミトコンドリアのリボソームタンパク質の異常が関連することなどが示唆されている。また疾患ではないが、ある種の抗生物質がミトコンドリアリボソームに誤作用して、難聴や骨髄抑制といった副作用をもたらすことも報告されている。

## 2. 哺乳類ミトコンドリアタンパク質合成系の分子機構

ミトコンドリアは、進化の過程で真核細胞に細菌が共生したものが起源であると言われており、ミトコンドリアの合成系の分子機構は原則的には原核生物のものと類似している。一方で、ミトコンドリアの合成系が様々なユニークな側面をもつことも指摘されている。ミトコンドリアリボソームは、RNA 成分が短縮化されてタンパク質成分がそれを補っているため、沈降係数は 55S と小さいもののバクテリアの 70S や真核細胞の 80S よりもかさ高い。ミトコンドリアの mRNA は全て SD 配列やキャップ構造といった先導配列を欠いた leaderless mRNA である。また、異常構造をもつ tRNA が利用されていること、変則暗号を使用していること、等が特徴である<sup>1)</sup>。

哺乳類ミトコンドリアにおけるタンパク質合成の分子機構は、開始複合体の形成反応や poly(U) 依存 poly(Phe) 合成系などの翻訳伸長反応について、渡辺ら (日本) や Spemulli ら (米) が精力的に試験管内で再構築を行って研究が進められてきた。その結果これまでに、開始過程と伸長過程の素過程については詳細が明らかにされて、これらの過程は原則的にはバクテリアのメカニズムに類似していることが分かっている<sup>2)</sup>。また、近年の微量 RNA の精製技術や配列解析技術の飛躍的な向上と相俟って、ミトコンドリア tRNA の RNA 修飾の欠損によって引き起こされるミトコンドリアにおける誤翻訳がミトコンドリア脳筋症の原因になることなども明らかにされている<sup>3)</sup>。

一方、あるミトコンドリア mRNA の終止コドンが欠失する病的変異が報告されていたことから<sup>4)</sup>、ミトコンドリアにおける翻訳終結の異常がヒト疾患と関連することが指

表 1 ミトコンドリア翻訳因子の異常による疾患

タンパク質性 mt 翻訳因子の変異による疾患をまとめた。mt rRNA や tRNA の病的変異については <http://www.mitomap.org/> に詳しい。また疾患ではないが、mt リボソームに作用して副作用をもたらす薬剤も報告されている (抗がん剤 oxazolidinone の投与による骨髄抑制, アミノグリコサイド系抗生物質の投与による難聴, など)。

原因遺伝子	病名・症状など	文 献
翻訳伸長因子 Ts (EF-Ts <sub>mt</sub> )	ミトコンドリア脳筋症, 致死性肥大型心筋症	Smeitink JA. <i>et al.</i> (2006)
翻訳伸長因子 Tu (EF-Tu <sub>mt</sub> )	新生児高乳酸血症, 乳児大脳白質萎縮症	Valente L. <i>et al.</i> (2006)
翻訳伸長因子 G (EF-G1 <sub>mt</sub> )	致死性新生児肝障害, 新生児高乳酸血症, 大脳白質萎縮症	Coenen MJH. <i>et al.</i> (2004), Antonicka H. <i>et al.</i> (2006), Valente L. <i>et al.</i> (2006)
翻訳開始因子 3 (IF-3 <sub>mt</sub> )	パーキンソン病	Abahuni N. <i>et al.</i> (2007)
MRPL37	パーキンソン病	Maraganore DM. <i>et al.</i> (2005)
MRPS6	パーキンソン病	Papapetropoulos S. <i>et al.</i> (2006)
MRPL32	遺伝性痙攣性対麻痺	Nolden M. <i>et al.</i> (2005)
MRPS16	胎児性脳疾患	Miller C. <i>et al.</i> (2004)
MRPS22	胎児性脳疾患	Saada A. <i>et al.</i> (2007)
AspRS <sub>mt</sub>	LBSL	Scheper GC. <i>et al.</i> (2007)
GlyRS <sub>mt</sub>	CMT2D	Chihara T. <i>et al.</i> (2007)
ArgRS <sub>mt</sub>	橋小脳形成不全	Edvardson S. <i>et al.</i> (2007)

摘されてきたが、ミトコンドリアにおける翻訳終結過程およびリボソーム再生過程のメカニズムは長い間不明だった。しかし近年、ミトコンドリアにおける翻訳終結過程とリボソーム再生過程のメカニズムはバクテリアのものとは異なる非常にユニークなものであることが明らかになりつつある。以下にその概要を述べる。

## 2.1 哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳終結機構

翻訳が終了してリボソームが終止コドンに到達した際、リボソーム上でペプチジル tRNA を加水分解してペプチドを放出するのがクラス 1 翻訳終結因子(ペプチド解離因子)である。哺乳類ミトコンドリアのペプチド解離因子である mtRF1a/RF1<sub>m</sub> は、2009 年に Lightowlers らと筆者らのグループによって独立に同定された<sup>5,6)</sup>。それまでバクテリア RF1 との相同性から、RF1<sub>m</sub> と呼ばれるタンパク質がミトコンドリアの翻訳終結因子であると考えられていたが、このタンパク質は実際に解析してみるとペプチド解離活性は示さず、別のバクテリア RF1 のホモログである mtRF1a/RF1<sub>m</sub> が UAA/UAG 終止コドン認識するペプチド解離因子であることが示された。一般に翻訳終結因子は保存された GGQ モチーフにおいてグルタミン残基がメチル化翻訳後修飾を受けることが知られている。筆者らは mtRF1a/RF1<sub>m</sub> もミトコンドリアに局在するメチル化酵素によりその GGQ モチーフがメチル化修飾を受けていることを明らかにした<sup>7)</sup>。ペプチドを放出した後のクラス 1 翻訳終結因子(ペプチド解離因子)がリボソームから解離するのを促進するのがクラス 2 翻訳終結因子であるが、バクテリアの中にはこれをもたないものもある。ミトコンドリアにはクラス 2 翻訳終結因子はないと考えられている。

ミトコンドリア DNA の配列に従うと、ミトコンドリアの 13 種の mRNA のうち、11 種が UAA/UAG 終止コドンを利用しているが、残りの 2 種の mRNA は終止コドンとして AGA/AGG を利用していると考えられてきた。AGA/AGG 終止コドン認識する翻訳終結因子はみつからないため、その解読機構の解明が課題として残っていたが、最近それら AGA/AGG コドン部位で -1 フレームシフトが起きて、実際には終止コドンとして UAG が利用されていることが示された<sup>8)</sup>。すなわちヒトミトコンドリアでは、AGA/AGG コドンは利用されないコドン (no-assigned codon) であり、終結因子は UAA/UAG 終止コドン認識する mtRF1a/RF1<sub>m</sub> 一つで十分であることが示唆された。

## 2.2 哺乳類ミトコンドリアにおけるリボソーム再生機構：EF-G<sub>m</sub> の発見

筆者らは、哺乳類ミトコンドリアのリボソーム再生過程についての解析を行い、哺乳類ミトコンドリアのタンパク質合成系では、翻訳因子がこれまでの例にないユニークな

役割分担をしていること、リボソーム再生過程に特化した新規の翻訳因子 EF-G<sub>m</sub> が利用されていること、を明らかにしたので以下で紹介したい<sup>9)</sup>。

翻訳終結後のリボソーム複合体 (post termination complex, PoTC) を解消するのがリボソーム再生過程である。バクテリアにおけるリボソーム再生過程では、翻訳伸長因子 G (EF-G) とリボソーム再生因子 (RRF) が協同的に働いて PoTC を解離する。バクテリアの EF-G は、このリボソーム再生過程に加えて翻訳伸長過程におけるトランスロケーション反応も担っており、タンパク質合成において二つの役割を担っている点で特徴的な翻訳因子である (図 1, 左)。

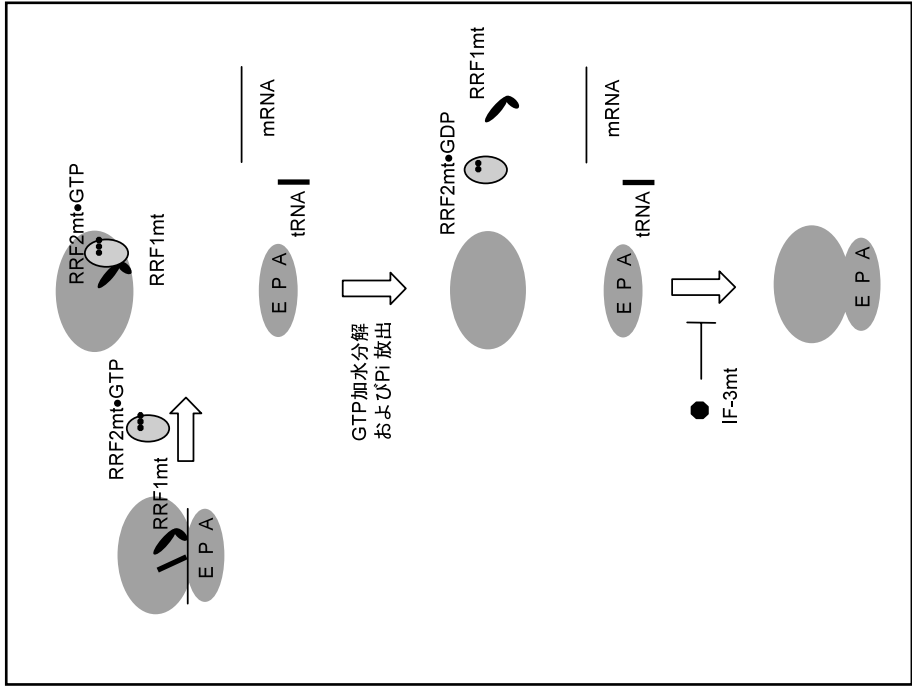
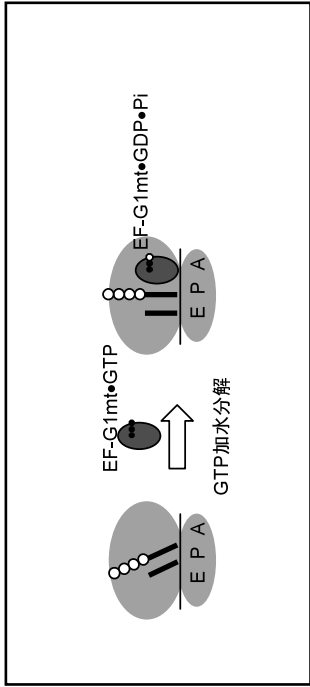
ヒト遺伝子データベースを探索すると、ミトコンドリアにバクテリア EF-G のホモログが二つ (EF-G1<sub>m</sub>, EF-G2<sub>m</sub>) 存在することが示唆された。既に EF-G1<sub>m</sub> についてはトランスロケーション活性が報告されており<sup>10)</sup>、一方 EF-G2<sub>m</sub> の機能は全く解析されていなかったが、それらはともにバクテリア EF-G に対応する分子であると考えられていたので、筆者らは EF-G1<sub>m</sub> と EF-G2<sub>m</sub> がともにリボソーム再生(トランスロケーション)を担っていると推測していた。しかし実際に調べてみると、ミトコンドリアのタンパク質合成系においては、バクテリア EF-G が担う二つの反応(トランスロケーション反応とリボソーム再生反応)が、EF-G1<sub>m</sub> と EF-G2<sub>m</sub> によって分担されていることが明らかになった (図 1, 右)。

まずリボソーム再生反応の解析に先立って、組換え体の EF-G1<sub>m</sub> と EF-G2<sub>m</sub> のトランスロケーション活性を調べた。EF-G1<sub>m</sub> は報告通り活性を示すものの、EF-G2<sub>m</sub> には活性が検出できなかった。一方、EF-G2<sub>m</sub> は EF-G ホモログに特徴的なリボソーム依存 GTPase 活性は保持していた。バクテリア EF-G は、トランスロケーション活性とは独立にリボソーム解離活性を示すこと、そのリボソーム解離活性にはリボソーム依存 GTPase 活性が必要であることが報告されていた<sup>11)</sup>。そこで EF-G2<sub>m</sub> がリボソーム再生過程に関与しているか調べた。

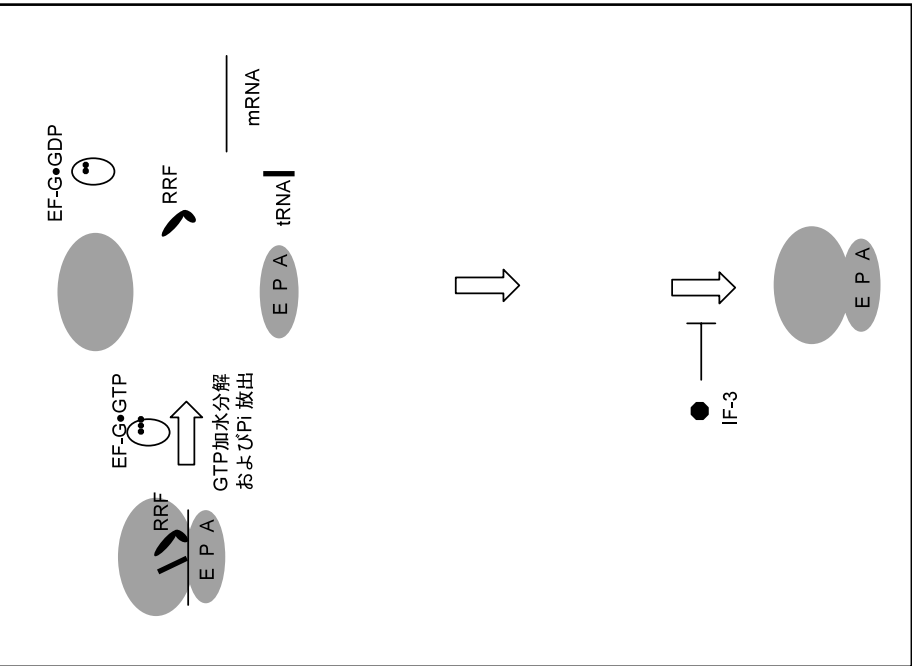
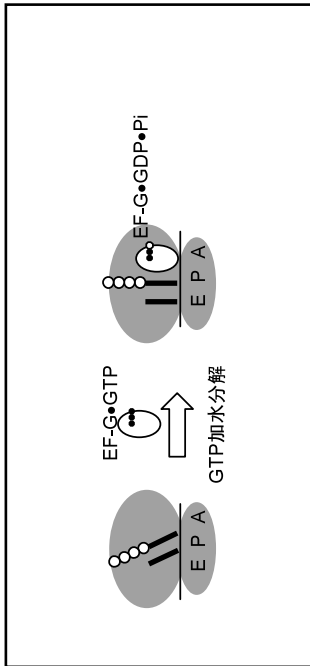
はじめに、大腸菌の再構築型生体外タンパク質合成系 (PURE system)<sup>12)</sup> を利用した (図 2A)。大腸菌 RRF を省いた PURE system でペプチドを single-round 翻訳させる (図 2A, 黒丸)。ここにリボソーム再生活性をもつ因子 (例えば大腸菌 RRF) を加えれば (図 2A, 白丸)、ペプチドの翻訳が multi-round になって翻訳効率が上昇するという仕組みである。ミトコンドリア EF-G2<sub>m</sub> と RRF<sub>m</sub> を加えてみたところ、翻訳効率の上昇がみられた (図 2A, 赤三角)。EF-G1<sub>m</sub> と RRF<sub>m</sub> はそのような効果を示さなかった (図 2A, 青ダイヤモンド)。

ポリソームブレイクダウンアッセイという手法により、リボソーム再生過程の特にリボソーム解離反応についても

哺乳類ミトコンドリア



原核細胞



伸長過程  
(トランスロケーション)

リボソーム  
再生過程

調べた(図2B)。このアッセイでは、モデル PoTCとして、大腸菌から調製したポリソームをピューロマイシン処理したものを利用する。こうして得られたポリソーム中のリボソームは PoTC のように mRNA と P-site にデアシル tRNA を結合している。例えば、モデル PoTC を GTP 存在下で大腸菌 EF-G および RRF とインキュベートした後、スクロース密度勾配によって解析する。因子を作用させていないポリソーム(図2B-1)と比較すると、大腸菌 EF-G と RRF によってポリソームが解離されて再会合した 70S リボソームが蓄積するのが観察できる(図2B-2)。ミトコンドリア EF-G<sub>2m</sub> と RRF<sub>m</sub> を作用させてみると、ポリソームが解離され、30S サブユニット、50S サブユニット、および再会合した 70S リボソームが蓄積した(図2B-3)。ミトコンドリア EF-G<sub>1m</sub> と RRF<sub>m</sub> を作用させた場合にはそのような効果はみられなかった(図2B-4)。

遺伝学的な解析も行った(図2C)。大腸菌 RRF 温度感受性株の非許容温度での生育障害は、ミトコンドリア EF-G<sub>2m</sub> と RRF<sub>m</sub> によって回復されたが、EF-G<sub>1m</sub> と RRF<sub>m</sub> によっては回復されなかった。

このような経緯で、予期せず、ミトコンドリアのタンパク質合成系においてトランスロケーション反応とリボソーム再生反応がそれぞれ EF-G<sub>1m</sub> と EF-G<sub>2m</sub> によって分担されていることが明らかになった。このことはすなわち、EF-G<sub>2m</sub> が翻訳伸長過程(トランスロケーション)には関与せず、リボソーム再生過程に特化した新規な翻訳因子であることも意味していた。EF-G<sub>2m</sub> (elongation factor G2, 翻訳伸長因子 G2) という名称は不適切だということで、その名称を RRF<sub>2m</sub> (リボソーム再生因子 2) と改めることを提唱した。

細菌のタンパク質合成系において中心的役割を担っている翻訳因子の多くが EF-G と構造的に関連したリボソーム依存 GTPase であり、例えば翻訳開始因子 2 (IF-2)、翻訳伸長因子 Tu (EF-Tu)、翻訳伸長因子 4 (EF-4/LepA)、翻訳終結因子 3 (RF-3)、などが挙げられる。これらの中で EF-G が、伸長過程(トランスロケーション)とリボソーム再生過程の二つの過程を担うことは、タンパク質合成における中心的翻訳因子の役割分担についての定説であったが、今回の EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub> の発見はそれを覆すものであり、これまでの教科書の記述にも修正が必要になる。EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub> の作用機序の詳細を更に解析してみ

ると、細菌 EF-G によるリボソーム解離反応とは異なり、EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub> による GTP 加水分解はリボソーム解離反応に必要なことなども明らかになった<sup>9)</sup>。ユニークな役割分担と作用機序ということから、翻訳因子(特にリボソーム依存 GTPase)の機能構造の研究に大きな影響を与えることになった。また、タンパク質合成系の進化についても新しい視点を提供し、実際にある種のミトコンドリアに近縁の細菌ではトランスロケーションとリボソーム再生反応が二つの EF-G ホモログによって分担されていることも発見された<sup>13)</sup>。

### 3. おわりに

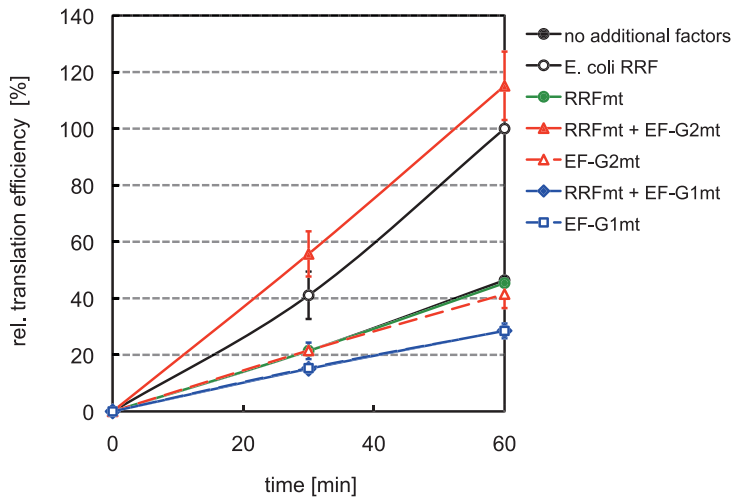
以上、哺乳類ミトコンドリアタンパク質合成系の研究についての最近の知見を交えながら、筆者らが発見した新規翻訳因子 EF-G<sub>2m</sub> について紹介させていただいた。これまで、natural mRNA を翻訳できる哺乳類ミトコンドリア生体外タンパク質合成系は報告されてこなかったが、最近筆者らは、再構築型生体外哺乳類ミトコンドリアタンパク質合成系『mtPURE system (mitochondrial PURE system)』を確立している。これは EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub> をはじめとして、ミトコンドリアの翻訳終結因子 (RF1<sub>m</sub>/mtRF1a) やリボソーム再生因子 (RRF<sub>1m</sub>, EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub>) を同定することにより可能になったものである。

さて、2003年に Agrawal らによってクライオ電子顕微鏡解析による哺乳類ミトコンドリアリボソームの構造が報告されたが<sup>14)</sup>、その構造は幾つかの点で正しい構造ではないように思われる。第一に、全てのリボソームに共通で正確なタンパク質合成に必要なだとされている E-site が無い(潰れてしまっている)こと、第二に、新生ペプチドの出口(exit tunnel)近傍にタンパク質が存在せず、大きな間隙ができてしまっていること、などが理由である。筆者らは、生化学的解析によって、ミトコンドリアリボソームが E-site を有することを示唆する結果を得ている。exit tunnel の構造はリボソームが翻訳するタンパク質の性質を反映して、リボソームの特徴がよく現れる部位で、例えば膜タンパク質ばかりを合成する酵母ミトコンドリアのリボソームの exit tunnel は、酵母ミトコンドリアのリボソームにユニークなりボソームタンパク質によって構成されていることが生化学的および遺伝学的解析によって示されている<sup>15)</sup>。それらの酵母ミトコンドリアのリボソームの exit

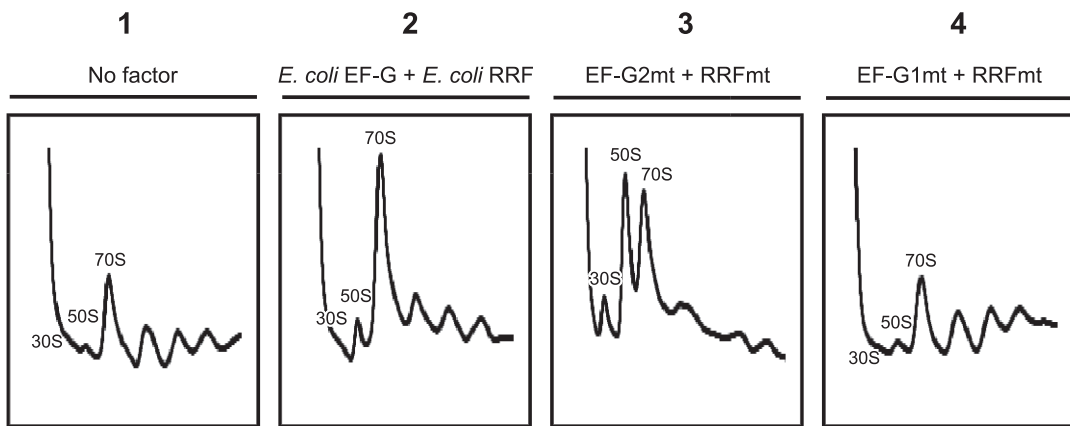
図1 ミトコンドリアでは、細菌 EF-G が担う二つの役割(トランスロケーションとリボソーム再生)が、EF-G<sub>1m</sub> と EF-G<sub>2m</sub> によって分担されている。

原核細胞と哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳伸長過程(トランスロケーション)とリボソーム再生過程の比較。左、原核細胞では、EF-G (白色) はトランスロケーションとリボソーム解離反応の両方を担う。またリボソーム再生過程において、EF-G による GTP 加水分解はリボソームの解離反応に必要な。右、哺乳類ミトコンドリアでは、EF-G<sub>1m</sub> (濃灰色) はトランスロケーションのみを担い、EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub> (淡灰色) はリボソーム解離反応のみを担う。EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub> による GTP 加水分解はリボソームの解離反応自体には必要なく、反応後 EF-G<sub>2m</sub>/RRF<sub>2m</sub> がリボソームから解離するために必要である。リボソーム上に tRNA 結合部位を示した (E, E-site; P, P-site; A, A-site.)。

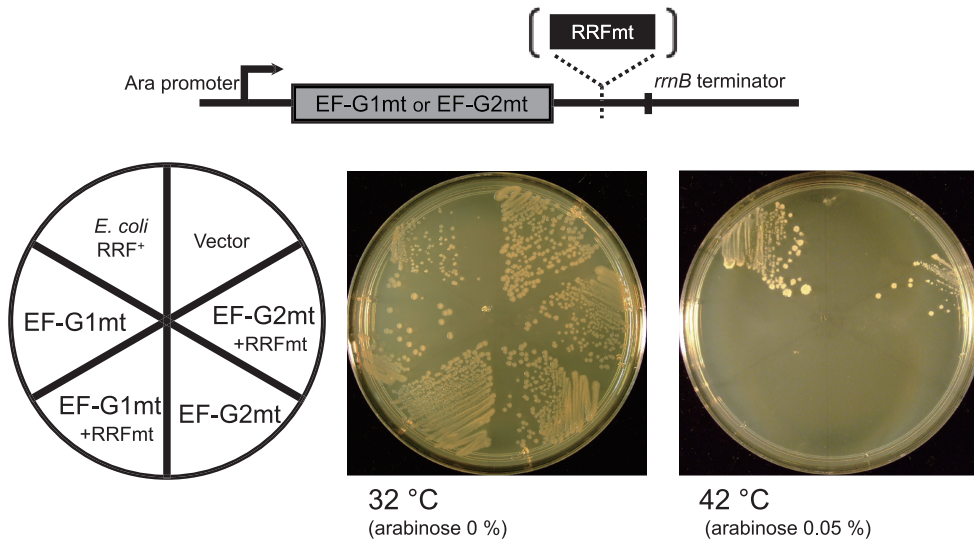
A



B



C



tunnelを構成するタンパク質は、幾つかの例外をのぞいて哺乳類では保存されていないので、哺乳類ミトコンドリアリボソムのexit tunnelは、哺乳類ミトコンドリアリボソムに特有なタンパク質によって構成されていることが推察される。生理機能を正しく反映したミトコンドリアリボソムの構造を高分解能で決定するためには、現在確立されている哺乳類ミトコンドリアリボソムの調製方法に改良を加える必要があるだろう。

生体外タンパク質合成系を活用し、また正しいミトコンドリアリボソムの構造を決定してゆくことで、これまで部分的にしか理解されてこなかったミトコンドリアのタンパク質合成のメカニズムを追求できると期待している。抗生物質デザインなどの医療応用にむけては、リボソムの構造をふくめたミトコンドリアのタンパク質合成のメカニズムについて、バクテリアや細胞質におけるそれらとの違いを分子レベルで明確にしてゆくことが重要である。

## 文 献

- 1) Watanabe, K. (2010) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.*, **86**, 11–39.
- 2) Spemullii, L.L., Coursey, A., Navratil, T., & Hunter, S.E. (2004) *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.*, **77**, 211–261.
- 3) Kirino, Y. & Suzuki, T. (2005) *RNA Biol.*, **2**, 41–44.
- 4) Temperley, R.J., Seneca, S.H., Tonska, K., Bartnik, E., Bindoff, L.A., Lightowers, R.N., & Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2003) *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2341–2348.
- 5) Soleimanpour-Lichaei, H.R., Kuhl, I., Gaisne, M., Passos, J.F., Wydro, M., Rorbach, J., Temperley, R., Bonnefoy, N., Tate, W., Lightowers, R., & Chrzanowska-Lightowers, Z. (2007) *Mol. Cell*, **27**, 745–757.
- 6) Nozaki, Y., Matsunaga, N., Ishizawa, T., Ueda, T., & Takeuchi, N. (2008) *Genes. Cells*, **13**, 429–438.
- 7) Ishizawa, T., Nozaki, Y., Ueda, T., & Takeuchi, N. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **373**, 99–103.
- 8) Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowers, R.N., & Chrzanowska-Lightowers, Z.M. (2010) *Science*, **327**, 301.
- 9) Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., Nierhaus, K.H., & Takeuchi, N. (2009) *Mol. Cell.*, **35**, 502–510.
- 10) Bhargava, K., Templeton, P., & Spemullii, L.L. (2004) *Protein Expr. Purif.*, **37**, 368–376.
- 11) Fujiwara, T., Ito, K., Yamami, T., & Nakamura, Y. (2004) *Mol. Microbiol.*, **53**, 517–528.
- 12) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001) *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751–755.
- 13) Suematsu, T., Yokobori, S.I., Morita, H., Yoshinari, S., Ueda, T., Kita, K., Takeuchi, N., & Watanabe, Y.I. (2010) *Mol. Microbiol.*, **75**, 1445–1454.
- 14) Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spemullii, L.L., & Agrawal, R.K. (2003) *Cell*, **115**, 97–108.
- 15) Ott, M. & Herrmann, J.M. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1803**, 767–775.

図2 EF-G2<sub>m</sub>は新規なりボソム再生因子である。

**A.** 生体外タンパク質合成系 (PURE system)<sup>12)</sup>を利用したEF-G1<sub>m</sub>とEF-G2<sub>m</sub>のりボソム再生反応の解析。大腸菌RRFを省いたPURE systemでペプチドをsingle-round翻訳させ、表記の因子を加えた効果を調べた。加えた因子にりボソム再生活性があれば、ペプチドの翻訳がmulti-roundになって翻訳効率が上昇する。従って大腸菌RRF(白丸)を加えると、何も加えない場合(黒丸)と比較して、翻訳効率が上昇する。EF-G2<sub>m</sub>とRRF<sub>m</sub>(赤三角)を加えると翻訳効率の上昇がみられたが、EF-G1<sub>m</sub>とRRF<sub>m</sub>(青ダイヤモンド)にはそのような効果はなかった。

**B.** ポリソームブレイクダウンアッセイによるEF-G1<sub>m</sub>とEF-G2<sub>m</sub>のりボソム解離活性の解析(アッセイの原理の詳細は本文を参照されたい)。モデルPoTCである大腸菌から調製したポリソームを表記の因子とインキュベートした後、スクロース密度勾配法によって解析した。大腸菌EF-GとRRFを作用させると(2)、因子を作用させていないポリソーム(1)と比較してポリソームが解離されて再会合した70Sリボソームが蓄積する。ミトコンドリアEF-G2<sub>m</sub>とRRF<sub>m</sub>を作用させると(3)、ポリソームが解離され、30Sサブユニット、50Sサブユニット、および再会合した70Sリボソームが蓄積した。ミトコンドリアEF-G1<sub>m</sub>とRRF<sub>m</sub>を作用させる場合には(4)、そのような効果はみられなかった。

**C.** 遺伝学的な解析によるEF-G1<sub>m</sub>とEF-G2<sub>m</sub>のりボソム再生活性の解析。大腸菌RRF温度感受性株は非許容温度で生育阻害がみられる。ミトコンドリアEF-G2<sub>m</sub>とRRF<sub>m</sub>を発現させると生育阻害は回復されたが、EF-G1<sub>m</sub>とRRF<sub>m</sub>によっては回復されない。