

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 22 日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/007724 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, 5/10 赤穂郡 上郡町光都 2-20-2 A-22 Hyogo (JP). 島田 秀夫 (SHIMADA, Hideo) [JP/JP]; 〒243-0431 神奈川県海老名市 上今泉 5-33-15 Kanagawa (JP). 下方 國稔 (SHIMOKATA, Kunitoshi) [JP/JP]; 〒136-0071 東京都江東区 亀戸 9-35-20 フジメイツ 1-303 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007252
- (22) 国際出願日: 2003 年 6 月 9 日 (09.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (74) 代理人: 下田 昭, 外 (SHIMODA, Akira et al.); 〒104-0031 東京都 中央区 京橋 3-3-4 京橋日英ビル 4 階 Tokyo (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): US.
- (30) 優先権データ: 特願 2002-202279 2002 年 7 月 11 日 (11.07.2002) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉川 信也 (YOSHIKAWA, Shinya) [JP/JP]; 〒678-1205 兵庫県

(54) Title: METHOD OF TRANSPORTING PROTEIN TO MITOCHONDRIA

(54) 発明の名称: タンパク質をミトコンドリアへ輸送する方法

(57) Abstract: It is intended to provide a means of transporting a protein to mitochondria without restraint of molecular weight, thereby making it possible to arbitrarily modify a protein synthesized in mitochondria and arbitrarily modify its function. Paying attention to the intracellular alignment (topology) of subunits, it is found out that a desired protein can be transported to mitochondria by using a transport signal inherent to a specific subunit. Such a subunit fulfills the following requirements: 1) being a subunit of a mitochondrial membrane protein encoded by nuclear DNA; and 2) in case of existing in a mitochondrial membrane, the N-end (preferably both of the N-end and the C-end) of the protein of the subunit existing in the mitochondrial matrix side.

(57) 要約: タンパク質を分子量による制限を受けずにミトコンドリアへ輸送することのできる手段を提供し、ミトコンドリアで合成されるタンパク質を自由に改変し、その機能を自由に改変することを可能とする。サブユニットの膜内での配向 (トポロジー) に注目し、特定のサブユニット固有の輸送シグナルを用いることにより、所望のタンパク質をミトコンドリアに輸送することができることを見出した。このようなサブユニットは次の条件を満たす。1) 核 DNA にコードされたミトコンドリアの膜タンパク質のサブユニットである。2) ミトコンドリアの膜に存在するときに、このサブユニットのタンパク質の N 末端、好ましくは N 末端と C 末端の両方、がミトコンドリアのマトリックス側に存在するサブユニットである。

WO 2004/007724 A1

明 細 書

タンパク質をミトコンドリアへ輸送する方法

5 技術分野

この発明は、特定のタンパク質を細胞質からミトコンドリアへ輸送する方法に関し、より詳細には、ミトコンドリアDNAにコードされるタンパク質を細胞質からミトコンドリアへ輸送し、ミトコンドリアDNAにコードされるタンパク質の機能を改変する方法に関する。

10

従来技術

細胞内のミトコンドリアは、炭水化物、脂質、タンパク質などがもつ化学エネルギーをATPの化学エネルギーに変換する役割を持ち、細胞の存続に不可欠であるが、ミトコンドリアにはDNAがあり、20種のアミノ酸に対応するtRNA、そしてリボゾームRNAの遺伝子情報をコードする。すなわちミトコンドリアは独自のタンパク質合成系をもつ。さらにミトコンドリアDNA (mtDNA) は上述したエネルギー変換反応（呼吸）を触媒する膜酵素の一部サブユニット遺伝子をコードする。

ミトコンドリアDNAを改変する方法として、これまで（A）当該遺伝子を金属微粒子に塗布して、ミトコンドリアに撃ち込み遺伝子導入する方法（Methods in Enzymology, 264, 265-278 (1996) 等）。（B）化学的にあるいは酵素を使ってmtDNAを消失させた細胞株を樹立し、そこに新たなmtDNAを導入する方法（Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 7288-7292 (1988) 等）。（C）さらに当該遺伝子を核に取り込ませ、細胞質で発現されたタンパク質をミトコンドリアに輸送させミトコンドリアの機能を改変する方法（Cell, 46, 837-844 (1986) 等）がすでに知られている。また今回の技術に関連する膜タンパク質の輸送としては、48個のアミノ酸残基からなる酵母のmtDNAにコードされるATP合成酵素のサブユニット8（S VIII）がミトコンドリアに輸送されミトコンドリアの機能回復に成功している（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,

2091-2095 (1988))。

本発明は、高等動物のm t DNAにコードされたマルチ膜貫通タンパク質の機能を改変する方法を開発することを課題とする。m t DNAにコードされたタンパク質の機能改変に採用されてきた従来の方法では、(A)の場合、撃ち込まれた
5 DNAが安定に保持される頻度が低く、また細胞内に数多くあるミトコンドリア全てに当該遺伝子が導入されることはない。したがって本方法はミトコンドリアの機能改変、すなわちミトコンドリア病治療技術としては不適切である。(B)の場合、遺伝子の改変方法としては原理的に正しい。しかしm t DNAを欠失させた細胞株の樹立が必要であり、しかしDNAが消失すると呼吸欠損になるため細胞の増殖が遅いなど問題が予想され、この場合も技術的に難しい。
10

一方(C)の方法であるが、ミトコンドリアのタンパク質合成系で使われる独自のコドン細胞質型に変更させる操作が必要であるが、一連の操作は比較的容易で、短期間で達成可能で、しかもタンパク質の輸送は、全てのミトコンドリアに均等に起こると予想されミトコンドリアの機能改変技術としては望ましい。

15 これまで(C)の方法で、失われたミトコンドリアの機能を回復するために、その機能を担うm t DNAにコードされる水溶性のタンパク質を輸送し、欠損した機能を部分的にではあるが回復することに成功したことが報告されている(Cell, 46, 837-844 (1986))。

またm t DNAにコードされた膜タンパク質の場合も、1回膜貫通型の酵母A
20 TP合成酵素のS VIIIを同様にミトコンドリアに輸送し機能発現に成功している。しかし8回膜貫通型のチトクロム*b* (呼吸系の*b c 1*複合体のサブユニット)、また12回膜貫通型のチトクロム酸化酵素のサブユニットI (S I)は、ミトコンドリアへの輸送は不可能と報告されている(Eur. J. Biochem. 228, 762-771 (1995))。ここでは輸送シグナルとしてA TP合成酵素のサブユニット
25 9の輸送シグナルを用いているが、このA TP合成酵素のサブユニット9はN及びC末端の両方がミトコンドリアの膜間空間側に存在している(Science 286, 1700 (1999)、上記サブユニット9はこの論文のサブユニット*c*に相当する。)。高分子量のタンパク質を輸送することが出来なかった理由は、この輸送シグナルの選択にあったものと考えられる。

発明が解決しようとする課題

上記のように従来技術においては、8回膜貫通型のチトクロム *b* や12回膜貫通型のチトクロム酸化酵素の S I のような分子量の大きいタンパク質をミトコンドリアへ輸送することが出来ないため、このようなタンパク質が分子量による制限を受けずにミトコンドリアへ輸送することのできる技術が求められていた。このような技術が可能になれば、ミトコンドリアで合成されるタンパク質を自由に改変することが可能になり、その結果、ミトコンドリアの機能を自由に改変することが可能になり、更に、ミトコンドリアの特定の機能の欠陥を治療する手段をもたらすことができる。

課題を解決するための手段

ミトコンドリアで合成されるタンパク質のうち、ミトコンドリアDNAにコードされるものは一部であり、その他は核DNAにコードされる。この核DNAにコードされたタンパク質は、ミトコンドリアの脂質二重層の外膜と内膜を通過するために、固有の輸送シグナル (Targeting signal、Sorting signal ともいう。) を連結して、ミトコンドリアに輸送される。輸送後、輸送シグナルは切り離される。

本発明者らは、サブユニットの膜内での配向 (トポロジー) に注目し、特定のサブユニット固有の輸送シグナルを用いることにより、所望のタンパク質をミトコンドリアに輸送することができることを見出し、本発明を完成させた。

このようなサブユニットは次の条件を満たすものである。1) 核DNAにコードされたミトコンドリアの膜タンパク質のサブユニットである。従って、このサブユニットは細胞質で発現し、ミトコンドリアへ輸送される。2) このサブユニットがミトコンドリアへ輸送され、ミトコンドリアの膜に存在するときに、このサブユニットのタンパク質のN末端、好ましくはN末端とC末端の両方、がミトコンドリアのマトリックス側に存在するサブユニットである。このようなサブユニットとして、2以上の偶数回膜貫通型が適当であると考えられる。このようなサブユニットに固有の輸送シグナルを用いることにより、上記課題を解決するこ

とができた。

即ち、本発明は、特定のタンパク質のN末端に輸送シグナルを結合させて、このタンパク質を細胞質からミトコンドリアへ輸送する方法であって、この輸送シグナルが、核DNAにコードされたミトコンドリアの膜タンパク質のサブユニットであって、そのサブユニットがミトコンドリアの膜に存在するときにそのN末端、好ましくはN末端とC末端の両方、がミトコンドリアのマトリックス側に存在するサブユニットの輸送シグナルであることを特徴とする方法である。

このようにして膜タンパク質のサブユニットをミトコンドリアへ輸送してミトコンドリア膜タンパク質を製造することができるので、本発明はまた、このようにして製造されたミトコンドリア膜タンパク質を有するミトコンドリアであり、このミトコンドリアから外膜が除去されたミトプラストであり、更に、このミトコンドリアを含む細胞である。

図面の簡単な説明

第1図は、ウシ心臓の筋肉から調製したミトコンドリアのS I 遺伝子を示す。TGA（一重下線）とATA（二重下線）は、それぞれTGGとATGに改変した。

第2図は、C端にヒスチジンタグ及びN端に輸送シグナルを結合させたウシチトクロムc酸化酵素のサブユニットIの発現ベクターを作製する過程を示す。

第3図は、精製ウシチトクロムc酸化酵素のS I と同じ移動度におけるSDS-PAGEを示す。(1)は、S I 遺伝子をもたないプラスミッドpRc/CMVを組み込ませたHeLa細胞（mock細胞）から調製したミトプラストのもの、(2)はプラスミッド(S I wt)を感染させたHeLa細胞から得たミトプラスト(WT)のもの、(3)はプラスミッド(pS I 51n)を感染させたHeLa細胞から得たミトプラスト(D51N)のものを示す。

第4図は、ウマチトクロムcの吸収スペクトルを示す。還元型チトクロムcは550nmに鋭い吸収を示すが、酸化型ではそれが消失する。

第5図は、チトクロムc酸化活性を示す。縦軸は550nmの吸光度を示し、減少（下方）は酸化が起こっていることを示す。横軸は時間を示す。傾きが急な

ほど活性が強いことを示す。白抜き矢印は還元型チトクロム *c* の添加を示す。左 (WT) は、野生型 S I を発現している細胞から調製したミトプラスト、右 (D 5 1 N) は、変異 S I (5 1 番目のアミノ酸をアスパラギンに変異させたサブユニット I) を発現しているミトプラストのものを示す。

- 5 第6図は、水素イオンの能動輸送活性を示す。縦軸は、水素イオン濃度を示し、下方ほど水素イオン濃度は高い。横軸は時間を示す。白抜き矢印は還元型チトクロム *c* の添加を示す。(A) は WT のもの、(B) は WT に脱共役剤を加えたもの、(C) は D 5 1 N のものを示す。

10 発明の実施の形態

- 本発明においては、まずタンパク質の N 末端に特定の輸送シグナルを結合させる。このような結合方法に特に制限はないが、タンパク質をコードする遺伝子に輸送シグナルをコードする塩基配列を、該タンパク質の N 末端に相当する端に結合するように、連結して核 DNA に導入すれば、細胞質でタンパク質の N 末端に輸送シグナルを結合した融合タンパク質を発現させることができる。この場合に、ミトコンドリアと核では遺伝コードに異なるものがあるため、ミトコンドリア遺伝子を核で同じタンパク質をもたらすよう適宜遺伝コードを改変する必要がある。

- また本発明の輸送の対象となるタンパク質は、いかなるタンパク質でもよいが、ミトコンドリア DNA にコードされるタンパク質に適用できることが本発明の特徴の一つである。

- このようなタンパク質として、本発明で採用した輸送シグナルを本来有しているサブユニットと配向が同じ、即ち、サブユニットがミトコンドリアの膜に存在するときにその N 末端と C 末端の両方がミトコンドリアのマトリックス側に存在するようなサブユニットが最も好ましい。このようなタンパク質として、チトクロム *b* やチトクロム酸化酵素の S I のようなミトコンドリアの膜タンパク質のサブユニットが挙げられる。

このような方法は、核 DNA にコードされるタンパク質、特に膜タンパク質にも適用することができる。

また、本発明の方法には、分子量による制限を受けるものではないので、分子

量が10,000～60,000のように大きいタンパク質に適用できるのも本発明の特徴の一つである。

上記のように、ミトコンドリアへ輸送されたタンパク質に結合していた輸送シグナルは切断除去され、この切断の結果残ったタンパク質はそのままミトコンドリア内で機能してもよいし、またこのタンパク質が、例えば、ミトコンドリア膜タンパク質のサブユニットの一つであるならば、このタンパク質とその他のサブユニットからミトコンドリア膜タンパク質が形成される。

この方法により、ミトコンドリアのタンパク質の機能を改変することができるし、またこのようなタンパク質に欠陥がある場合には正常のものに直すこともできる。

発明の効果

本発明の方法は、ミトコンドリアDNAにコードされたマルチ膜貫通タンパク質に依存した様々な機能を人為的に改変させることを可能にする。12回膜貫通型のチトクロム酸化酵素のS Iで成功したことは、これまでミトコンドリアへの輸送不可能と言われていた8回膜貫通型のチトクロムbについても、このタンパク質が前者のタンパク質と膜内での配向が同じであるので、今回の方法で機能変換が可能である。両タンパク質ともミトコンドリアの呼吸で中心的な役割を担っており、したがってタンパク質の変異によって惹起される重篤な遺伝子疾患の治療が可能になる。また本方法は遺伝病の治療のみならずミトコンドリアの膜タンパク質の機能、機能と構造との関連を研究する際にも有効な方法である。また、核DNAにコードされる膜タンパク質を新たにミトコンドリアに輸送させ、ミトコンドリアに新規機能を付与させることも可能となる。

以下、実施例により本発明を例証するが、これらは本発明を制限することを意図したものではない。

本実施例で対象としたチトクロム酸化酵素は、ミトコンドリアに由来する3つのサブユニット（S I－III）と核にコードされ細胞質からミトコンドリアに輸送される10個のサブユニットからなる。S Iは本酵素の活性中心を担うもつ

とも重要なサブユニットである。本実施例では、このS Iをミトコンドリアに輸送し機能発現を達成させるため、膜内での配向（トポロジー）が同じであって、N末端がマトリックス側にあるS I V（1回膜貫通型）に注目して、そのN-末端に結合していたミトコンドリア輸送シグナル（配列番号6）をS IのN末端に融合させ細胞質からミトコンドリアに輸送させた。

またヒトの遺伝子治療を考慮してヒト培養細胞を選択した。このS I Vのミトコンドリア輸送シグナルを利用して細胞質からミトコンドリアへタンパク質が輸送されたことはない。但し、酵母のチトクロム酸化酵素のS I Vの輸送シグナルを使った報告（The EMBO J. 4, 2061-2068, 1985）があるが、酵母のS I Vはほ乳類チトクロム酸化酵素のS Vに対応し、膜貫通部分はなく、また輸送シグナルは異なっている。

本実施例では、野生型ウシチトクロム酸化酵素のS Iと、S IのN末端から51番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変異させた二つの遺伝子をそれぞれヒトのHeLa細胞の染色体に組み込んだ。ミトコンドリアに輸送させたS Iを検知するためS IのC末端にヒスチジンタグ（ヒスチジンが6つ連続したアミノ酸配列）を付け加えた。機能の検討には、S I遺伝子が染色体に組み込まれた培養細胞を増殖させ、そこからミトコンドリアを調製して、ミトコンドリアのチトクロムc酸化活性と水素イオン能動輸送活性を測定した。

20 S I 遺伝子のクローニング

新鮮なウシ心臓の筋肉からミトコンドリアを調製し、常法によってミトコンドリアDNA（mtDNA）を得た。ウシ心筋のmtDNAは、すでに遺伝子配列が決定されているので（J. Mol. Biol. 156, 683-717 (1982)）、その配列を利用して、配列番号2及び3に示す合成DNAを用いてPCR法によってS I遺伝子（第1図、配列番号1）のみを増幅させて当該遺伝子をクローン化し、プラスミドpUC18のマルチクローニングサイトに挿入した（第2図（A））。このプラスミドをpSImと名付けた。なお、配列番号2の合成DNAの4～9番目の塩基は制限酵素Sac I、配列番号3の合成DNAの4～9番目の塩基はPst Iのそれぞれ切断部位である。増幅されたサブユニットI遺伝子は両端

に上記の制限酵素切断部位をもつため、切断し得られた *Sac* I-*Pst* I DNA断片を上記のプラスミッドに挿入した。

塩基の改変

- 5 なお、ミトコンドリア遺伝子でTGAとATAは、それぞれトリプトファンとメチオニンをコードするが、核にそのまま組み込まれると、それらは翻訳停止とイソロイシンに対応するので、S I 遺伝子（第1図）上の上記配列をそれぞれ細胞質でトリプトファンとメチオニンに翻訳されるようにTGGとATGに改変した。改変は通常の部位特異的変異方法を用いた。改変した遺伝子を担うプラスミッドをp S I と名付けた。
- 10 また51番目のアスパラギン酸をアスパラギンになるようにp S I の塩基を改変した。塩基の配列とその改変はDNA sequencerで確認した。

塩基配列ヒスチジntagの付加と発現ベクターの調製

- 15 上記プラスミッドp S I をPCRの鋳型として、配列番号4の合成DNAとTakara Biomedical 社のpUC用の逆プライマー（配列番号5）を使用して、ヒスチジntagをC末端にもつS I 遺伝子を増幅させた（第2図（B）上）。配列番号4で示す上記プライマーの3～8番目の塩基は、制限酵素*Bgl* I I I切断部位、12～29番目の塩基は、ヒスチジntagをコードする配列と相補的な部分をそれぞれ示す。得られたS I 遺伝子を含むDNA断片を*Sac* I-*Bgl* I I Iで切断後（第2図（B）中）、pUC18の*Sac* Iと*Bam* H I部位に挿入し（切断された後の突出部位が*Bgl* I I Iのそれと相補的なので結合が可能）、プラスミッドp S I -h tを得た（第2図（B）下）。
- 20

輸送シグナルの付加

輸送シグナルとなるアミノ酸配列（配列番号6）を以下の方法でS I 遺伝子に結合させた。

2つのオリゴヌクレオチド（配列番号7及び8、配列番号7の3～8番目は*Sac* I、配列番号8の2～7番目は*Sp* I I切断部位を示し、配列番号7の3

5～55番目と配列番号8の20～40番目は相補的配列を示す。)を合成し、これらの相補的配列で2つのDNAを結合させPCR法で完全な2本鎖DNAを調製した。

続いて、*Sac*Iで切断し、他端は平滑末端のままpUC19の*Sac*Iと
5 *Sma*I部位(*Sma*I切断で平滑末端を生じる)に挿入した(第2図(C)
上)。ここから*Eco*RI-*Spl*I DNA断片を切り出した(第2図(C)
上の矢印)。

一方pS I-h tのS I遺伝子を*Spl*I部位をもつ配列番号9のプライマ
ーとTakara Biomedical社のpUC用ユニバーサルプライマー(配列番号1
10 0)で増幅し(第2図(C)中)、得られたDNA断片を*Spl*Iと*Pst*I
で切断して(第2図(C)中の矢印)、上記の*Eco*RI-*Spl*I DNA断片
と併せてpBluescript KSに挿入し、プラスミッドpB/SIWを得た(第2
図(C)下)。

15 発現ベクターの調製

プラスミッドpB/SIWから*Hind*IIIと*Not*IでS I遺伝子を
切り出し、Invitrogen社のプラスミッドpRc/CMVに挿入し、発現ベク
ターpS Iwt(野生型)を得た。

51番目のアミノ酸をアスパラギンに変異させたサブユニットI(変異S I)
20 も上と同様に処理してpS I51nを得た。

培養細胞への組み込み

上記2種のプラスミッド(S Iwt、pS I51n)をそれぞれHeLa細胞
にQiagenのEffectene transfection reagentを用いて感染させ、10%
25 のfetal bovine serumを含むDulbecco's modified Eagle's培地で培
養し、つづいて抗生物質であるgeneticin存在下で増殖するコロニーを選択し
た。

ミトコンドリアの調製と活性測定

これら2種の培養細胞を、それぞれ geneticin を含む上記培地で培養し、シャーレ内で細胞が100%コンフルエントになると培養を止め、細胞を集めた。得られた細胞を0.2M ショ糖と0.5mM EDTAを含む10mM HEPES-KOH (pH7.4) 緩衝液中でポッター型硝子攪拌装置(フッ素樹脂ペッスル)を用いて細胞を破壊し、常法によりミトコンドリアを得た。さらに常法通りにミトコンドリアを低張液で処理して0.2M ショ糖と0.02%牛血清アルブミンを含む1mM HEPES-KOH (pH7.0) に懸濁してミトコンドリアの外膜が破壊されたミトプラストを調製した。野生型のS Iを発現させた細胞から得たミトプラストを「WT」、変異S Iのミトプラストを「D51N」で表す。

ウエスタンブロット法によるサブユニットIの検出

上記のように調製したミトプラストを0.1% SDSに溶かし常法によってSDS-PAGEの電気泳動を行い、PVDF膜に転写したのちヒスチジンタグ抗体と反応させた。その結果を第3図に示す。第3図(2)はWTのもの、第3図(3)はD51Nのものを示す。両者とも、精製ウシチトクロムc酸化酵素のS Iと同じ移動度のところにタンパク質の存在を認めた。

一方、S I遺伝子をもたないプラスミッドpRc/CMVを組み込ませたHeLa細胞(mock細胞)から調製したミトプラストには、上記のタンパク質は認められなかった(第3図(1))。

チトクロムc酸化活性の測定

還元型ウマチトクロムcを調製して上記ミトプラストと25℃で反応させた。還元型チトクロムcは550nmに鋭い吸収を示すが、酸化され酸化型になると、その吸収は消失する(第4図)。そこで還元型チトクロムcの酸化活性を550nmの波長で追跡した。

反応液(660μl)は以下の通り。10mM HEPES-KOH (pH7.0)の緩衝液で、50mM KCl, 0.2M ショ糖, 40nmol/mg Nエチルマレイミド、0.2nmol/mg アンチマイシンA、45pmol/

mg バリノマイシン、 $2.0 \mu\text{M}$ ロテノン、 11.3 nmol/ml オリゴマイシン、と $1.0 \mu\text{M}$ ミクソチアゾールを含む。ミトプラストは約 $50 \mu\text{g}$ を加えた。

反応は 8.4 nmol の還元型チトクロム *c* を添加して始めた。チトクロム *c* によりチトクロム *c* 酸化酵素に電子が送り込まれると、チトクロム *c* は酸化型となり、 550 nm の吸収が減少する。その様子を第5図に示す。

野生型 S I (WT) を発現している細胞から調製したミトプラストはシアンによって阻害される速やかなチトクロム *c* 酸化活性を示し (第5図左)、活性は mock 細胞から得たミトプラストとほぼ同じであった。

一方、変異 S I (D51N: 51番目のアミノ酸をアスパラギンに変異させたサブユニット I) を発現しているミトプラストも速やかなチトクロム *c* 酸化活性を示した (第5図右)。比活性で比較すると、むしろ野生型の S I を含むミトプラストより30%程高かったが、ほぼ同じと考えられる。

15 水素イオン能動輸送活性の測定

また上記と同様の2種のミトプラストについて水素イオンの能動輸送活性を測定した。水素イオンの能動輸送活性は、上と同じ反応液の条件だが、緩衝液の濃度は 0.5 mM に下げた。反応液中の水素イオン濃度の変化はベックマン社の pHメーターモデル $\phi 660$ と同社の複合電極 (BECKMAN、511082) を使った。測定は還元型チトクロム *c* の添加によって起こる反応液の水素イオン濃度変化を追跡した。その結果を第6図に示す。下方ほど水素イオン濃度は高い。

還元型チトクロム *c* の添加後、野生型の S I を発現しているミトプラスト (WT) では、顕著な反応液の酸性化が起こった (第6図 (A)、a で示す領域)。しかし時間経過とともに反応液はアルカリ化した。これは還元型チトクロム *c* が酸化されると、同時に酸素は水に還元され水素イオンがミトプラスト内で消費された結果である。ミトプラストの膜は水素イオンを通し難いが完全ではないので非酵素的に水素イオンが膜を通過する。これは *back flow* としてよく知られた現象である。反応開始後の酸性化 (第6図 (A)、a で示す領域) は、本酵素による水素イオンの能動輸送の結果であり、膜が水素イオン通しにくいために過渡

的に観察される。

しかし、反応開始前に脱共役剤 (p-trifluoromethoxy carboxyl-cyanide phenylhydrazine) を $10 \mu\text{g}$ 加えて、水素イオンが膜の中を自由に出入りできるようにすると、最初の酸性化は消失した (第6図 (B))。

- 5 変異酵素 (D 5 1 N) の場合は、還元型チトクロム *c* の添加によって起こる酸性化が起こらなかった (第6図 (C))。これは水素イオンの能動輸送が顕著に減少した、あるいは消失したことを示す。

- この結果は、変異によって培養細胞のチトクロム *c* 酸化活性はほとんど影響を受けなかったものの、もう一方の機能である水素イオン能動輸送活性が顕著に低下したことを示す。この実験事実、細胞質からミトコンドリアに輸送されたウシ S I によってミトコンドリアの機能改変が実現したことを示す。
- 10

請求の範囲

1. 特定のタンパク質のN末端に輸送シグナルを結合させて、このタンパク質を細胞質からミトコンドリアへ輸送する方法であって、この輸送シグナルが、核DNAにコードされたミトコンドリアの膜タンパク質のサブユニットであって、そのサブユニットがミトコンドリアの膜に存在するときにそのN末端がミトコンドリアのマトリックス側に存在するサブユニットの輸送シグナルであることを特徴とする方法。
2. 前記サブユニットがミトコンドリアの膜に存在するときにそのN末端とC末端の両方がミトコンドリアのマトリックス側に存在する請求項1に記載の方法。
3. 前記特定のタンパク質の分子量が10,000～60,000である請求項1又は2に記載の方法。
4. 前記特定のタンパク質がミトコンドリアDNAにコードされるタンパク質である請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
5. 前記ミトコンドリアDNAにコードされるタンパク質が、ミトコンドリアの膜タンパク質のサブユニットである請求項4に記載の方法。
6. 前記タンパク質が改変されたことを特徴とする請求項4又は5に記載の方法。
7. 請求項5又は6に記載の方法によりミトコンドリアへ輸送された前記タンパク質から前記輸送シグナルが切断除去され、切断の結果残ったタンパク質及びその他のサブユニットからミトコンドリア膜タンパク質が形成されることから成る、ミトコンドリア膜タンパク質の製法。
8. 請求項7に記載の方法により、ミトコンドリアDNAにコードされるタンパク質の機能を改変する方法。
9. 請求項7に記載の方法により製造されたミトコンドリア膜タンパク質を有するミトコンドリア。
10. 請求項9に記載のミトコンドリアから外膜が除去されたミトプラスト。
11. 請求項9に記載のミトコンドリアを含む細胞。

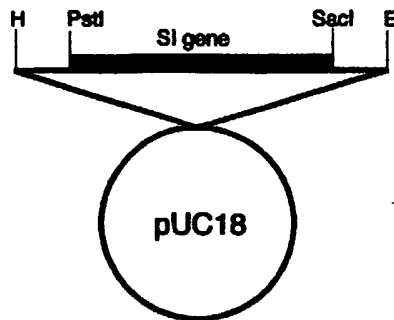
第 1 図

ATGTTCAATTAACCGCTGACTATTCTCAACCAACCATAAAGATATTGGTACCCTTTATCTA
CTATTTGGTGCTTGGGCCGGTATAGTAGGAACAGCTCTAAGCCTTCTAATTCGCGCTGAA
TTAGGCCAACCCGGAACCTCTGCTCGGAGACGACCAAATCTACAACGTAGTTGTAACCGCA
CACGCATTTGTAATAATCTTCTTCATAGTAATACCAATCATAATTGGAGGATTGGGTAAC
TGACTTGTTCCTTAATAATTGGTGCTCCCGATATAGCATTTCCTCCGAATAAATAATATA
AGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCATTCTACTACTCCTCGCATCCTCTATAGTTGAAGCT
GGGGCAGGAACAGGCTGAACCGTGATCCCTCCCTTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCAGGA
GCTTCAGTAGATCTAACCATTTTCTCTTTACACTTAGCAGGAGTTTCCTCAATTTTAGGA
GCCATCAACTTCATTACAACAATTATCAACATAAAGCCCCCGCAATGTACAATACCAA
ACCCCTCTGTTCTGATGATCCGTAATAATTACCGCCGTAATACTACTACTCTCGCTCCCT
GTATTAGCAGCCGGCATCACAATGCTATTAACAGACCGGAACCTAAATACAACCTTCTTC
GACCCGGCAGGAGGAGGAGACCCTATTCTATATCAACACTTATTCTGATTCTTTGGACAC
CCCGAAGTCTATATTTTAATCTTACCTGGGTTTGGAATAATCTCTCATATCGTGACCTAC
TACTCAGGAAAAAAGAACCATTCCGGATATATGGGAATAGTTTGGGCTATAATGTCAATC
GGATTTCTAGGTTTCATCGTATGAGCCCACCATATATTCACTGTGGAATAGACGTCGAC
ACACGAGCCTACTTCACATCAGCCACTATAATTATTGCTATTCCAACCGGGGTAAAAGTC
TTCAGCTGATTGGCAACACTTCATGGAGGTAATATCAAATGGTCTCCTGCTATAATGTGA
GCCCTAGGCTTTATTTTCTTATTTACAGTAGGGGGTTTAACTGGAATTGTCTTAGCCAAC
TCTTCCCTCGATATTGTTCTTCACGACACATACTACGTTGTGCGACATTTCCACTATGTT
TTATCAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGGGGGGATTGTTTCATTGATTCCCACTATTC
TCAGGTTATACTCTCAACGATACATGAGCCAAAATCCACTTCGCAATTATATTTGTAGGC
GTCAATATAACCTTCTTCCCACAACACTTTCTAGGACTATCTGGCATGCCTCGACGATAC
TCCGACTACCCAGATGCATACACAATATGAAATACTATCTCATCAATAGGCTCATTCATT
TCCCTAACAGCAGTTATACTAATAGTTTTCATCATCTGAGAAGCATTTCATCTAAACGA
GAAGTCTTGACTGTAGACTTAACCACGACAAATCTAGAATGATTAAACGGATGCCCTCCA
CCATATCACACATTTGAAGAACCACCTATGTTAACCTAAATAA

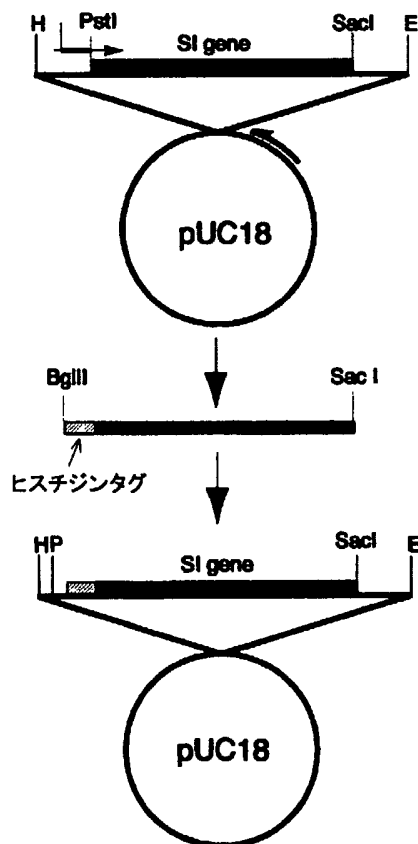
2/4

第2図

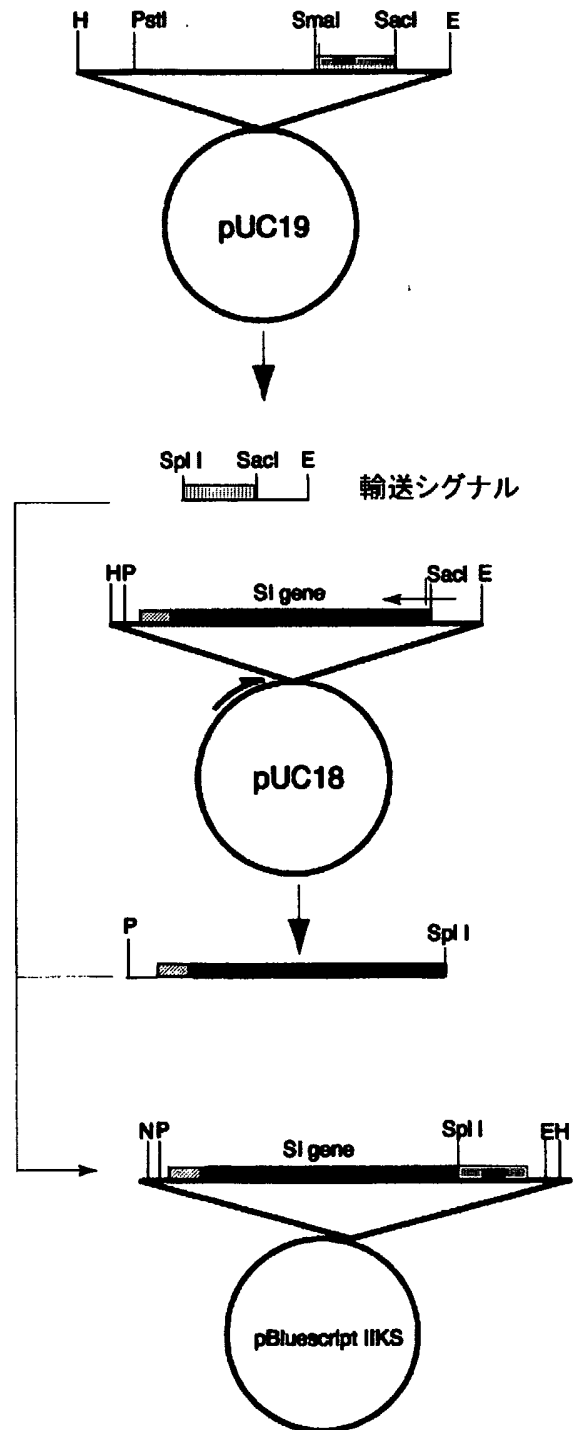
(A) SI遺伝子のクローニング



(B) ヒスチジンタグの付加

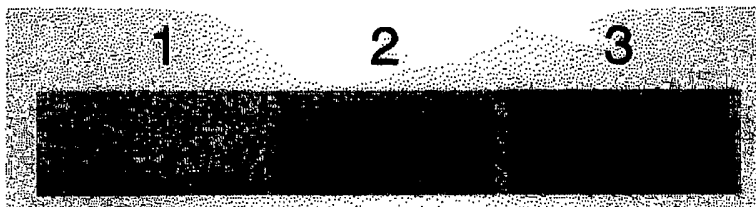


(C) 輸送シグナルの付加

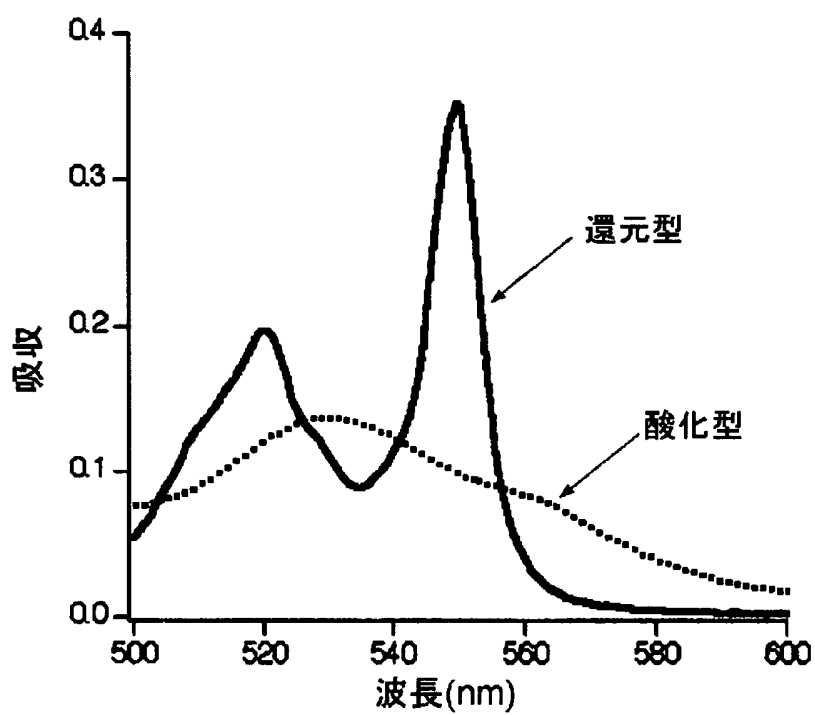


3/4

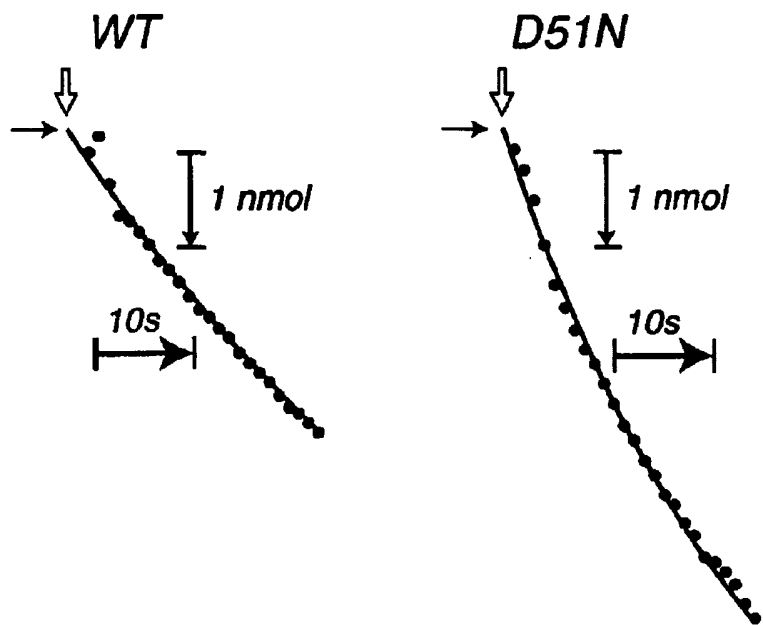
第3図



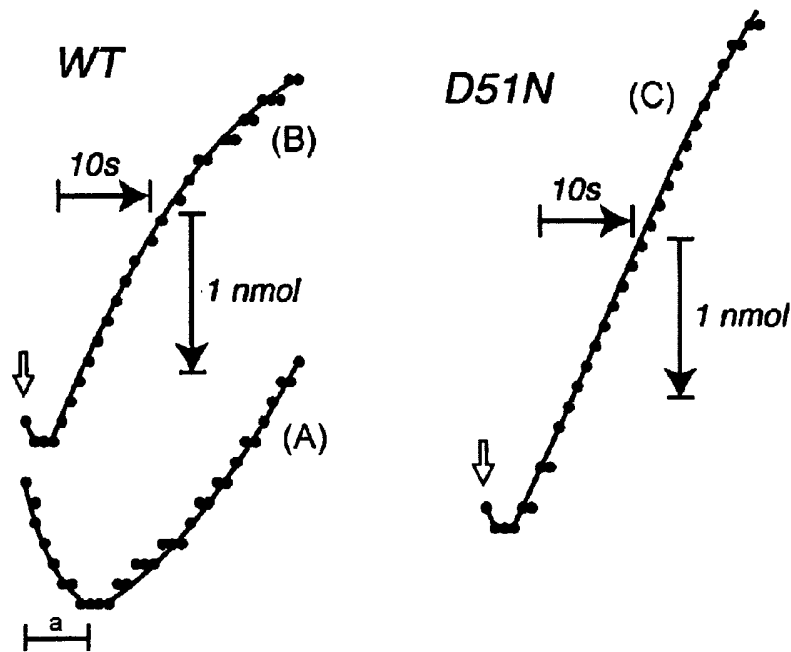
第4図



第 5 図



第 6 図



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> タンパク質をミトコンドリアへ輸送する方法

<130> FS03-312PCT

<160> 10

<210> 1

<211> 1545

<212> DNA

<213> subunit I of bovine cytochrome c oxidase

<400> 1

atgttcatta accgctgget atttcaacc aaccataaag atattggtac cttttatcta	60
ctatttgggtg cttgggccgg tatggttagga acagctctaa gccttctaata tcgcgctgaa	120
ttaggccaaac ccggaactct gctcggagac gaccaaatct acaacgtagt tgtaaccgca	180
cacgcatttg taatgatctt cttcatggta atgccaatca tgattggagg attcggtaac	240
tggtctgttc ccctaataat tggtgctccc gatatggcat ttccccgaat gaataatatg	300
agcttctggc tcttccctcc ctcatccta ctactcctcg catcctctat ggttgaagct	360
ggggcaggaa caggctggac cgtgtaccct cccttagcag gcaacctagc ccatgcagga	420
gcttcagtag atctaaccat tttctcttta cacttagcag gagtttctc aatttttagga	480
gccatcaact tcattacaac aattatcaac ataaagcccc ccgcaatgtc acaataccaa	540
acccctctgt tcgtatggtc cgtaataatt accgccgtac tactactact ctgcctcct	600
gtattagcag ccggcatcac aatgctatta acagaccgga acctaaatac aaccttcttc	660
gaccgccgag gaggaggaga cctattcta tatcaacact tattctggtt ctttggacac	720
cccgaagtct atattttaat cttacctggg tttggaatga tctctcatat cgtgacctac	780
tactcaggaa aaaaagaacc attcggatat atgggaatgg tttgggctat aatgtcaatc	840
ggatttctag gtttcatcgt atgggccac catatgttca ctgtcggaat ggacgtcgac	900
acacgagcct acttcacatc agccactatg attattgcta ttccaaccgg ggtaaaagtc	960
ttcagctggt tggcaacact tcatggaggt aatatcaaat ggtctcctgc tatgatgtgg	1020
gccctaggct ttattttctt atttacagta gggggtttaa ctggaattgt cttagccaac	1080
tcttccctcg atattgttct tcacgacaca tactacgttg tcgcacattt ccactatggt	1140

ttatcaatgg gagctgtatt tgctattatg gggggatttg ttcattggtt cccactattc 1200
tcaggttata ctctcaacga tacatgggcc aaaatccact tcgcaattat gttttaggc 1260
gtcaatatga ctttcttccc acaacacttt ctaggactat ctggcatgcc tcgacgatac 1320
tccgactacc cagatgcata cacaatgttg aatactatct catcaatggg ctcattcatt 1380
tcctaacag cagttatact aatggttttc atcatctggg aagcatttgc atctaaacga 1440
gaagtcttga ctgtagactt aaccacgaca aatctagaat ggttaaacgg atgcctcca 1500
ccatatacaca catttgaaga acccacctat gttaacctaa aataa 1545

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 2

attgagctca tgttcattaa ccgctggcta ttctcaacc 39

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 3

cttctgcagt tatttttaggt taacataggt g 31

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 4

ccagatcttt agtgatgatg gtggtgatgt ttaggttaa cataggtggg 50

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 5

caggaaacag ctatgac

17

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> subunit IV of bovine cytochrome c oxidase

<400> 6

Met Leu Ala Thr Arg Val Phe Ser Leu Ile Gly Arg Arg Ala Ile Ser

1

5

10

15

Thr Ser Val Cys Val Arg

20

25

30

<210> 7

<211> 55

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 7

aagagctcat gttggcaacc agagtattta gcctgattgg taggcgtgca atttc

55

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 8

ccgtacgcac accgaggtgg aaattgcacg cctaccaatc

40

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 9

tgcgtagcga tggtcattaa ccgctggc

28

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 10

gttttcccag tcacgac

17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/07252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lomax M.I. et al., Isolation and characterization of a cDNA clone for bovine cytochrome c oxidase subunit IV, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1984, Vol.81, No.20, pages 6295-9	1-11
Y	Wang Y. et al., The presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase requires the presence of an alpha-helix at its N-terminal region which is stabilized by the helix at its Ctermini, J.Biol. Chem., 1993, Vol.268, No.7, pages 4759-65	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
--	---

Date of the actual completion of the international search
02 September, 2003 (02.09.03)

Date of mailing of the international search report
16 September, 2003 (16.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N5/10		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N5/10		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus(JOIS) BIOSIS(DIALOG) WPI(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Lomax M. I. et al., Isolation and characterization of a cDNA clone for bovine cytochrome c oxidase subunit IV, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, Vol.81, No.20, pages 6295-9	1-11
Y	Wang Y. et al., The presequence of rat liver aldehyde dehydrogenase requires the presence of an alpha-helix at its N-terminal region which is stabilized by the helix at its C termini, J. Biol. Chem., 1993, Vol.268, No.7, pages 4759-65	1-11
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.09.03	国際調査報告の発送日 16.09.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	