

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」
平成14年度採択研究代表者

遠藤 斗志也

(名古屋大学大学院理学研究科 教授)

「タンパク質トランスロケータの作動原理の解明」

1. 研究実施の概要

細胞は、生体膜で仕切られた区画にタンパク質を適切に配置することにより、複雑な細胞機能を統御している。生体膜を舞台とするタンパク質の配置は、タンパク質トランスロケータによって制御される。われわれは、ミトコンドリアおよび小胞体の膜系におけるプロテインマシンであるトランスロケータの作動原理について、以下の観点から分子レベルで理解しようとしている。

(1-1) トランスロケータは、局在化シグナルをどのように認識するのか？

一つのプレ配列中に受容体Tom20による認識配列が複数書込まれている例を見だし、これらがミトコンドリア移行の特異性と外膜透過の効率の両方に関わることを明らかにした。

(1-2) トランスロケータの新規構成因子の同定と機能解析

ミトコンドリアのトランスロケータの新規サブユニットTim50を発見した。Tim50はTim23との相互作用を通じてタンパク質のミトコンドリア外膜透過と内膜透過を共役することを明らかにした。

(1-3) トランスロケータチャネルはただの孔か？

ミトコンドリアタンパク質の外膜透過を担うTom40の孔がただの孔ではなく、シャペロン機能を有することを見いだした。

(1-4) 小胞体のトランスロケータの作動原理を明らかにする。

小胞体膜での膜高効率で制御可能なポリペプチド鎖透過無細胞実験系を確立し、この実験系を用いて、ポリペプチド鎖の膜を横断した移動の駆動力を測定している。トランスロケータで、電荷間相互作用によって複数回膜貫通膜タンパク質の組み込みが駆動される新しい機構を見出した。今後、膜透過と膜組み込みの一分子解析、トランスロケータ内でのシグナル配列の配置解析を進行させる予定である。

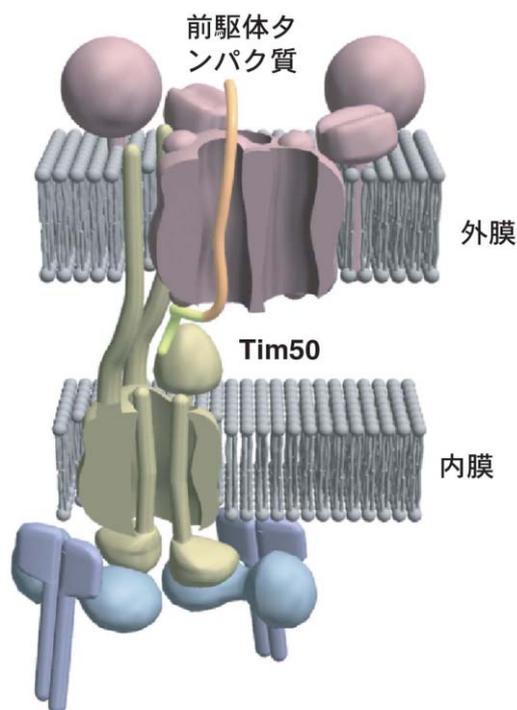
2. 研究実施内容

ミトコンドリアのトランスロケータ

われわれは、プレ配列には複数のマトリクス移行シグナルが書き込まれており、複数のプレ配列結合タンパク質がこれらのシグナルを認識するという「多重シグナルモデル」を提案した。このモデルに基づく長いプレ配列pSu9中の受容体Tom20結合部位をを検証するために、Tom20以外のプレ配列結合部位を調べたところ、二つ存在することが分かった。このうちのN端側結合部位はミトコンドリア移行の特異性を決め、C端側結合部位は、外膜透過の効率を上げることが分かった。

ミトコンドリアは二つの膜（外膜と内膜）で囲まれているので、ミトコンドリアのマトリクスに向かうタンパク質は、外膜と内膜のトランスロケータにより二枚の膜を通過することになるが、この際、何らかの仕組みにより、外膜透過と内膜透過がうまく協調して行われる必要がある。今回われわれは、ミトコンドリア内膜のトランスロケータを構成する新因子としてTim50を発見し、Tim50はTIM23複合体の新規サブユニットで、前駆体タンパク質の内膜透過に必須であること、特にTim23とともに外膜から内膜への前駆タンパク質の効率良い移動に関わっていることを見いだした。言い換えれば、長い間謎であった、ミトコンドリアの外膜と内膜の膜透過プロセスの共役を担う因子がTim50である可能性が高い。

タンパク質を通すトランスロケータのチャネル、すなわち「孔」はどんな孔なのか。われわれは、ミトコンドリア外膜でタンパク質の通る孔をつくるTom40とその中をヒモのようになって通り抜けるタンパク質の空間的な位置関係を、「部位特異的光架橋法」等で解析した。その結果、Tom40は通過して出ていったら、自分ではまだ立体構造をつくれずに凝集してしまうなどの危険がある場合は、一人前になれる準備が整うまで内部に留め置き、保護する役目を持っていることが分かった。このことは、Tom40には、タンパク質が孔に入る前に立体構造を作ってしまった場合は、孔に入るためにそれをヒモのようにほどく働きもある可能性を示唆する。



小胞体のトランスロケータ

アミノ末端を膜透過させるシグナル配列「1型シグナルアンカー配列」による大きなドメインの膜透過を詳細に解析できる無細胞実験系を確立した。200アミノ酸残基以上のドメインに低分子化合物を結合させることによって透過を抑制し、条件を整えた後にこの化合物を解離させることによって、膜透過を再開させることができる。この実験系で、トランスロケータ内でのポリペプチド鎖の移動自体には、高エネルギーリン酸化合物が不要なこと、ミトコンドリアなどで膜透過を駆動することが明らかになっている内腔側の熱ショックタンパク質 (hsp70、BiP) がかわらないこと、トランスロケータに結合したリボソームが必須なことなどを解明した。ここで確立した実験系では、アミノ酸配列以外の「トランスの因子」によってトポロジー制御が可能であることを示しており、新たな膜ナノテクノロジーへの発展が期待される。同時に、トランスロケータ内でのポリペプチド鎖の配置やダイナミクスを解析し、疎水性配列の膜貫通トポロジーは確定するのが予想以上に遅いことを明らかにしている。また、トランスロケータ内でおきる膜組み込み過程で、電荷間相互作用によって駆動される高極性セグメントの膜内への配置機構を見出した。

3. 研究実施体制

名大グループ

- ① 研究分担グループ長：遠藤 斗志也 (名古屋大学大学院理学研究科/名古屋大学高等研究院 教授)
- ② 研究項目：ミトコンドリアトランスロケータの作動原理の解明
九大 (平成16年度より兵庫県立大) グループ
- ① 研究分担グループ長：阪口 雅郎 (九州大学 大学院医学研究院 助教授；
平成16年度より兵庫県立大学 大学院 生命理学研究科 教授)
- ② 研究項目：小胞体トランスロケータの作動原理の解明

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

名大チーム

- S. Nishikawa, Y. Terazawa, T. Nakayama, A. Hirata, and T. Endo
Nep98p is a component of the yeast spindle pole body and essential for nuclear division and fusion
J. Biol. Chem. 278, 9938-9943 (2003)
- T. Obita, T. Muto, T. Endo, and D. Kohda
Peptide library approach with a disulfide tether to refine the Tom20 recognition motif in mitochondrial presequences
J. Mol. Biol. 328, 495-504 (2003)

- T. Yoshihisa, K. Esaki, C. Ohshima, N. Tanaka, and T. Endo
Possibility of Cytoplasmic pre-tRNA Splicing: the Yeast tRNA Splicing
Endonuclease Mainly Localizes on the Mitochondria
Mol. Biol. Cell 14, 3266-3279 (2003)
- T. Endo, H. Yamamoto, and M. Esaki
Functional cooperation and separation of translocators in protein import
into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. (Commentary
Article)
J. Cell Science 116. 3259-67 (2003)
- M. Esaki, T. Kanamori, S. Nishikawa, I. Shin, P. G. Schultz, and T. Endo
Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents
their aggregation
Nature Struct. Biol. 10, 988-994 (2003)
- T. Asai, T. Takahashi, M. Esaki, S. Nishikawa, K. Ohtsuka, M. Nakai, and T.
Endo
Re-investigation of the requirement of cytosolic ATP for mitochondrial
protein import
J. Biol. Chem, 279, 19464-19470 (2004)

九大チーム

- Horie, C., Suzuki, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2003)
Targeting and assembly of mitochondrial tail-anchored protein Tom5 to the
TOM complex depend on a signal distinct from that of tail-anchored proteins
dispersed in the membrane
J. Biol. Chem. 278 (42), 41462-41471.
- Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., and Uozumi,
N. (2003)
Topogenesis of two transmembrane type K⁺ channels, Kir 2.1 and KcsA
J. Biol. Chem. 278 (41), 40373-40384.
- Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., and Uozumi, N. (2003)
Molecular dissection of the contribution of negatively and positively
charged residues in S2, S3, and S4 to the final membrane topology of the
voltage sensor in the K⁺ channel, KAT1
J. Biol. Chem. 278 (15), 13227-13234.

- Kanki, T., Young, M.T., Sakaguchi, M., Hamasaki, N. and Tanner, M.J.A. (2003)
The N-terminal region of the transmembrane domain of human erythrocyte band 3: Residues critical for membrane insertion and transport activity.
J. Biol. Chem. 278 (8), 5564-5573.
- Sato, Y., Hosoo, Y., Sakaguchi, M., Uozumi, N. (2003)
Requirement of negative residues, Asp 95 and Asp 105, in S2 on membrane integration of a voltage-dependent K⁺ channel, KAT1
Biosci. Biotechnol. Biochem., 67 (4), 923-926.
- Nakamura, Y., Suzuki, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2004)
Targeting and assembly of rat mitochondrial translocase of outer membrane 22 (TOM22) into the TOM complex
J. Biol. Chem. 279 (20), 21223 - 21232.