

戦略的創造研究推進事業  
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の  
構築と利用」

研究課題「タンパク質トランスロケータの作動原理  
の解明」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

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)

## 1 研究実施の概要

### 1-1 研究の構想と実施

細胞内で遺伝情報に基づいて翻訳されたポリペプチド鎖としてのタンパク質が機能を発現するためには、働くべき場所に正しく移動しなければならない。すなわち合成されたタンパク質の多くは、膜で仕切られた目的地すなわち細胞内区画（真核生物ではオルガネラ）に正しく配送され、膜タンパク質の場合は正しい配向性で膜に組み込まねばならない。こうしたタンパク質の交通、生体膜を舞台とするタンパク質の配置において中心的役割を担うのが、各膜系のタンパク質複合体、トランスロケータ（トランスロコン、トランスロケースとも呼ばれる）である。

トランスロケータはタンパク質を特定の方向に膜透過させ、特定の配向で膜に組込む巧妙な分子機械、プロテインマシンである。一般に、前駆体に書き込まれた行き先（局在化）シグナルを読みとるレセプター、タンパク質を通過させる孔（チャンネル）、そしてポリペプチド鎖の移動を制御するモータの三つの機能単位から成る。局在化シグナルは基質（前駆体）タンパク質自身に書き込まれ、標的化する膜系（オルガネラ）、オルガネラ内での仕分け先、さらに膜タンパク質の場合は膜への組込みの配向性を指定する。レセプターにより選別された基質タンパク質は、高次構造がほどかれてチャンネルに入り、モータ機能によりチャンネル内を一方方向に移動する。膜タンパク質の場合は、膜貫通セグメントが現れたところで膜透過が停止し、ラテラル（水平）方向にチャンネルが開いてリン脂質二分子膜に組込まれることが考えられる。

本研究では、ミトコンドリア及び小胞体の膜系において前駆体タンパク質の膜透過、膜への組込みの分子機構を研究してきた遠藤グループと阪口グループが協力して、各膜系におけるトランスロケータを分子機械として捉え、その機能の共通性と特異性を明らかにしつつ、トランスロケータの作動原理を明らかにすることをめざした。解明すべき具体的な問題として、以下の5項目を設定した。

- (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？
- (2) トランスロケータのチャンネルはどんな機能を持っているのか？
- (3) トランスロケータのモータ機能は何によって駆動されるのか？
- (4) トランスロケータはタンパク質をどのように膜に組込むのか？
- (5) トランスロケータ複合体の立体構造解析

さらに本研究の推進の過程で、当該分野の研究動向の変化に対応するため、

- (6) 未同定のトランスロケータ構成因子の探索と同定も、めざすこととした。

トランスロケータの作動原理の解明を進めていく中で、トランスロケータは安定な複合体ではなく、むしろ構造的にも組成的にも動的な装置であることが機能に重要であることがわかってきた。このことは、構造解析に適した安定な複合体を単離することが困難であることも意味する。そこで、構造解析においては、トランスロケータ構成因子（あるいはその機能単位）レベルでの構造決定とサブユニット間相互作用の高空間分解能解析に力点をおくとともに、

- (7) トランスロケータ自身の動的性質を解析する実験系と手法を開発することもめざした。

### 1-2 得られた成果

#### 【ミトコンドリアのトランスロケータ】

研究を進めていく過程で、新規因子の同定が緊急の課題となった。そしてゲノム情報と生化学的解析を併用した系統的探索を集中的に行った結果、新規因子として Tom38, Tom13, Tim40, Tim15, Tam41 の5種類のタンパク質を発見することができた。このうち、Tom38, Tom13, Tim40 はタンパク質のミトコンドリア移行に直接関わる因子であり、Tim15 と Tam41 はミトコンドリアタンパク質移行システムの機能維持に関わる因子である。すなわち、



ルがあり、どちらが正しいかについて長く論争が続いてきた。今回、mtHsp70 をほどけたポリペプチド鎖上を進む分子モータとしてとらえたときの mtHsp70 のステップサイズを測定することにより、ブラウンラチェットモデルが正しいことを示すことができた。常に激しい溶媒分子の衝突にさらされてブラウン運動が起こっているミクロの世界では、正確な機械的運動に基づくパワーstrokeよりは、揺らぎによる運動の一部を取り出して分子を動かすブラウンラチェットの方が、効率的かつ省エネルギー的であると言えるのかもしれない。一方、プレ配列が短い場合についても、部分的にほどけた基質前駆体タンパク質にトランスロケータそのものが結合してアンフォールディング中間体を不安定化することにより、mtHsp70 を介せずに前駆体をアンフォールドする仕組みを明らかにした。

トランスロケータはその受容体サブユニットが前駆体タンパク質の行き先シグナルを認識し、正しい基質のみを膜透過させる。しかし受容体サブユニットには、行き先シグナル認識以外に、膜透過効率を上げる機能があることを見いだした。すなわち、長いプレ配列の中には受容体 Tom20 による認識部位を二ヶ所に持つものがあり、N 端側の認識部位と Tom20 の相互作用は行き先シグナル認識の働きをするが、C 端側の認識部位と Tom20 の相互作用は、プレ配列の外膜透過を促進することがわかった。したがって長いプレ配列は、ミトコンドリアへの輸送の特異性に加えてミトコンドリアへの輸送の効率をあげるよう、進化の過程で最適化されてきたことが考えられる。

ミトコンドリアのマトリクスへの効率的なタンパク質移行には、外膜透過と内膜透過が共役することが必要となる。この共役に関わる因子である内膜 TIM23 複合体の構成因子 Tim50 は、内膜でミトコンドリア移行シグナルを認識する受容体として働くことを NMR によって明らかにした。外膜だけでなく、内膜のトランスロケータも前駆体のミトコンドリア行きシグナルを認識することで、前駆体の配送と仕分けの精度を上げていることが考えられる。

さらにミトコンドリア内での仕分け経路の分岐の仕組みについて、バレル型膜タンパク質のアセンブリー経路が、マトリクスや内膜に向かう経路から分岐する仕組み、内膜に向かう複数回膜貫通型内膜タンパク質のアセンブリー経路がマトリクスに向かう経路から分岐する仕組みを明らかにした。さらに TIM23 複合体中の Tim23-Tim50 の膜間部ドメインが、膜間部側での受容体としての機能だけでなく、マトリクス側でのモータ機能にも関わる多機能因子として機能することを見いだした。トランスロケータの構成因子の特定ドメインが特定の役割のみを担うのではなく、膜透過過程の様々なステップに同時に関わることは、トランスロケータという分子機械の作動原理を考えるうえで興味深い。

#### 【小胞体のトランスロケータ】

阪口グループは小胞体トランスロケータのポリペプチド鎖輸送機構の理解を目指して次の3項目について研究を推進した。第1に、真核細胞の小胞体トランスロケータ複合体の構造解析のために、単離精製を試みた。タグ-標識したサブユニットを安定的に発現する細胞株を作成し、アフィニティー補足による単離にまで至っている。並行して、高効率膜透過実験系を使って、膜透過途中のポリペプチド鎖を内在したトランスロケータ複合体の作成を試みた。まず、低分子リガンドの結合を利用して大きなドメイン (DHFR ドメイン) の膜透過の制御に成功した。次いで、アミノ末端の親和性タグによって N-末端ドメインの膜透過をコントロールすることに成功し、構造解析に向けて機能中間体の単離を進行中である。

第2に、ポリペプチド鎖輸送の駆動機構を追及した。小胞体トランスロケータでは、多くの場合が透過とタンパク質合成が共役しているために駆動作用を合成過程と分離して解析することが困難であった。そこで、1型シグナルアンカー配列によるアミノ末端側ドメインの膜透過系を整備した。アミノ末端に配置した DHFR ドメインは、250 残基を超える長さにも関わらず定量的な膜透過が可能であった。さらに DHFR ドメインの膜透過を低分子薬

剤（メトトレキセート）の結合によって一時停止させ、その除去によって再スタートさせることも可能となった。この中間状態を利用して膜透過という複雑な現象をいくつかのステップに分けて解析し、ポリペプチド鎖の移動には意外にも ATP 等の高エネルギー化合物や小胞体内腔のシャペロンが関与しないこと、シグナル配列のトランスロケータチャンネルへの進入が膜透過を駆動すること、トランスロケータ機能維持のためにリボソームの寄与が必須なことなどを明らかにした。また、ストレプトアビジン結合性タグ（SBP-tag）を活用したより簡便な膜透過制御手法を開発した。タグ配列の改変やタグ結合タンパク質を滴定することにより、膜透過の異なる段階での膜透過駆動力を定量化し、透過開始時点で働く引き込み駆動力は、定常的にポリペプチド鎖が動く後半の駆動力に比べてより大きなものであることや、膜透過駆動力がシグナル配列自体によって供給されることを明らかにした。

第3に、トランスロケータチャンネルによる膜タンパク質の膜組み込み作用を追及した。SBP-tag によって膜透過をトラップし、その後半に配置した膜貫通配列の膜組み込みを詳細に解析した。いくつかの異なる透過中間状態でトラップされたポリペプチド鎖はトランスロケータチャンネルの異なる場所を占有すると考えられたが、いずれもその後半に配置した膜貫通配列の膜組み込みを阻止しなかった。逆にこれらの後半のセグメントがトランスロケータ内に存在しても、アミノ末端の膜透過中間状態が維持されることがわかった。このようにして、トランスロケータは 2 本の親水性配列を膜透過中間状態で維持しながら、複数の膜貫通セグメントを膜組み込みさせることができる、驚くべき柔軟性を備えたチャンネルであることが明らかになった。これらの知見より、複数のトランスロケータチャンネルが協調して機能するモデルを提唱した。さらに、疎水性配列以外の膜透過制御要因として知られる正荷電アミノ酸残基の作用機構を追及し、疎水性配列の配向決定にも、ポリペプチド鎖膜透過抑制にも、これまで考えられてきたよりはるかに長距離の作用が有効なことを明らかにした。以上、小胞体トランスロケータの駆動要因、配列識別範囲、予想外の許容特性を明らかにすることができた。

## 2 研究構想及び実施体制

### (1) 研究構想

#### 当初の研究計画の概要

これまでは、タンパク質は合成されれば自発的にフォールディングしてネイティブな構造を獲得して機能を果たすという、自立した存在と考えられてきた。しかし近年、細胞内のタンパク質は多くの場合むしろ従属的な存在であり、細胞内に周到に用意されたシステムにより、その動態を監視され、助けられ、制御されてはじめて正しく機能を果たせる、ということが明らかになってきた。

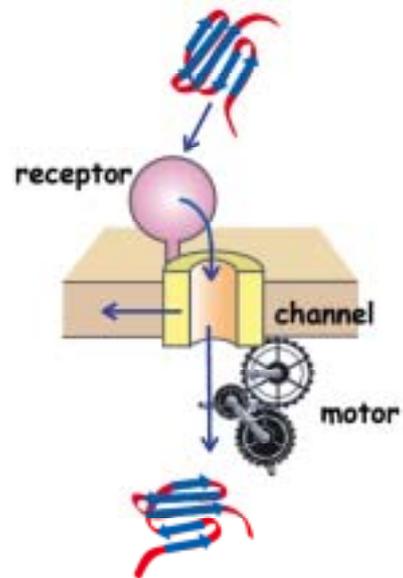
細胞内で遺伝情報に基づいて翻訳されたポリペプチド鎖としてのタンパク質が機能を発現するためには、ネイティブ構造（機能構造）に折れたたまる必要がある。さらに合成されたタンパク質の多くは、膜で仕切られた目的地すなわち細胞内区画（真核生物ではオルガネラ）に正しく配送され、膜タンパク質の場合は正しい配向性で膜に組み込まねばならない。こうしたタンパク質の交通、生体膜を舞台とするタンパク質の配置を実現するのは、分子シャペロンやタンパク質トランスロケータなどから成る交通管制システムである。そしてこのシステムの中心的役割を担うのがトランスロケータ（トランスロコン、トランスロケースとも呼ばれる）である。

トランスロケータは、複数の膜タンパク質サブユニットから成る複合体であり、タンパク質を特定の方向に膜透過させ、特定の配向で膜に組込む巧妙な分子機械、プロテインマシンである。一般に、前駆体書き込まれた行き先（局在化）シグナルを読みとるレセプター、タンパク質を通過させる孔（チャンネル）、そしてポリペプチド鎖の移動を制御するモータの三つの機能単位から成る。局在化シグナルは基質（前駆体）タンパク質自身に書き込まれ、標的化する膜系（オルガネラ）、オルガネラ内での仕分け先、さらに膜タンパク質の場合は膜への組込みの配向性を指定する。レセプターにより選別された基質タンパク質は、高次構造がほどかれてチャンネルに入り、モータ機能によりチャンネル内を一方方向に移動する。膜タンパク質の場合は、膜貫通セグメントが現れたところで膜透過が停止し、ラテラル（水平）方向にチャンネルが開いてリン脂質二分子膜に組込まれることが考えられる。

研究開始時（平成 14 年）には、様々な膜系においてトランスロケータの実体（トランスロケータの種類、各トランスロケータの構成因子など）はかなり理解が進んでいたが、各トランスロケータが作動する仕組みについては、まだほとんど分かっていないという状況であった。一方、研究代表者（遠藤）および分担者（阪口）は、各々ミトコンドリアおよび小胞体の膜系において、前駆体タンパク質の膜透過、膜への組込みの分子機構を研究してきた。そこで両研究グループが連携して、各膜系におけるトランスロケータを分子機械として捉え、その機能の共通性と特異性を明らかにしつつ、トランスロケータの作動原理を明らかにすることを計画した。具体的には、遠藤グループはミトコンドリアのトランスロケータ、阪口グループは小胞体のトランスロケータを対象として、以下の諸問題の解決を目標とした。

#### (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？

タンパク質には目的地を示すシグナルが書き込まれているが、その実体および認識機構は必ずしも明らかではない。たとえばミトコンドリアマトリクスに移行する前駆体タンパク質では、N 末端に局在化シグナルを含むプレ配列が付加されているが、様々なプレ配列を比較しても共通するコンセンサス配列は見いだせず、「両親媒性ヘリックス」をつくるとい



うあいまいな物理化学的性質が共通するだけである。この理由として、前駆体（のプレ配列）には複数の局在化シグナルが一部オ・バ・ラップして書き込まれており、それを複数のレセプターサブユニットが独立に認識することが考えられる（多重シグナルモデル）。遠藤グループは既に、プレ配列とその受容体 Tom20 の複合体の NMR 構造を決定しており、同様の解析をトランスロケータの他のプレ配列結合サブユニット等に適用することにより、局在化シグナルの実体とその認識メカニズムの解明が期待された。

#### (2) トランスロケータのチャンネルはどんな機能を持っているのか？

トランスロケータのチャンネルについては、親水性チャンネルであることが分かっている程度で、構造的知見も含めて情報が乏しかった。一方で遠藤らは、ミトコンドリアのトランスロケータチャンネルがただの孔ではなく、たとえばシャペロン機能がある可能性を見いだしつつあった。またミトコンドリアでは、外膜から内膜への効率良い前駆体の移動を実現するためには、外膜と内膜のトランスロケータの膜透過を共役させる仕組みが必要であるが（そうでないと前駆体が膜間部に蓄積してしまう）、その機構も全く不明であった。さらにトランスロケータチャンネルは、膜の透過障壁を保つためにゲート開閉が厳密に制御される必要があり、さらに膜タンパク質を膜に組込むためにはラテラル方向への開閉も制御される必要がある。こうしたゲート機能の実体も全く不明であった。そこで、トランスロケータのチャンネル自身の多彩な機能とその制御機構の解明をめざした。

#### (3) トランスロケータのモータ機能は何によって駆動されるのか？

タンパク質の膜透過は能動輸送（濃度勾配に逆らい、エネルギーを必要とする）であり、また前駆体の高次構造のアンフォールディングを伴わねばならない。それではトランスロケータは、マクスウェルの悪魔の力を借りずに、どのようにして前駆体タンパク質を一方方向に効率良く移動させ、また高次構造を形成したドメインであっても効率良くアンフォールドできるのか？ミトコンドリア内膜や小胞体膜では、膜のトランス側の分子シャペロン Hsp70 がタンパク質を引っ張る駆動力として働くが、そのメカニズムが「pulling」か「trapping」かが大きな論争となっていた。そこでこの論争に決着をつけることを、最重要目標とした。一方、ミトコンドリア外膜や小胞体膜では、ATP や膜電位などのエネルギーを使わない膜透過が、効率良く起こる。そこで、この不思議な現象の仕組み、駆動力の実体の解明もめざした。

#### (4) トランスロケータはタンパク質をどのように膜に組込むのか？

膜タンパク質の膜への組込みの配向性や膜内での構造形成は、トランスロケータによって制御される。しかしこの組込み、構造形成の規則や、膜内での構造形成の一般的原理は十分に解明されていなかった。そこで、膜タンパク質側の様々なシグナルを識別し、膜への組込みの配向を規定するトランスロケータ側の「配向決定デバイス」の実体を明らかにすることをめざした。またトランスロケータチャンネル内での膜貫通セグメントのアセンブリや、膜貫通セグメントのラテラル方向への離脱の素過程をモニタリング解析し、トランスロケータが膜貫通セグメントのアセンブリ状況を感じ、チャンネルのラテラル方向のゲーティングを制御する機構を検討することとした。

#### (5) トランスロケータ複合体全体の立体構造解析

トランスロケータの作動原理を総合的に理解するためには、最終的にはトランスロケータ複合体全体の立体構造の情報が必要である。そこで、酵母ミトコンドリアトランスロケータや、動物小胞体のトランスロケータについて、構成サブユニット及び、トランスロケータ全体の構造解明をめざした。このためにトランスロケータ複合体全体の大量精製、歳構成、および結晶化に向けた実験系の確立を検討することとした。

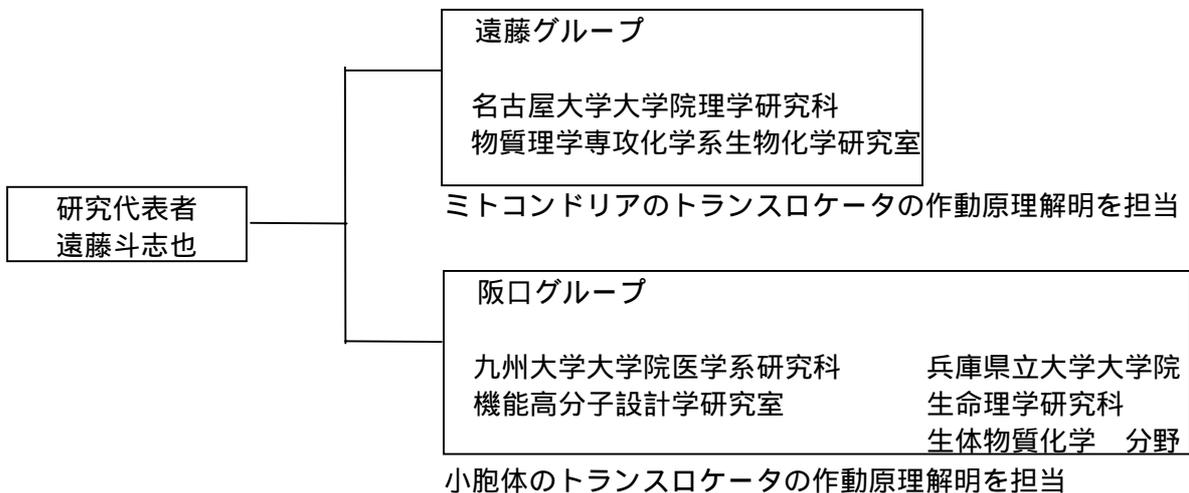
### その後新しく生まれた研究目標

本研究の推進の過程で、遠藤グループを含む複数のグループによってミトコンドリアのトランスロケータを構成する新因子が次々に発見され、トランスロケータの機能が従来考えられていたよりもはるかに多彩で、その関係プレーがはるかに複雑であることが分かってきた。新規トランスロケータの存在も示唆された。そこで、(6)未同定のトランスロケータ構成因子の探索と同定をまずは緊急の目標に設定して、集中的に研究を推進するとともに、新因子の機能の解明、新因子が関わる新たなトランスロケータ、局在化経路の解明をめざすこととした。

トランスロケータの作動原理の解明を進めていく中で、トランスロケータは安定な複合体ではなく、むしろ構造的にも組成的にも動的な装置であることが機能に重要であること、したがってその機能を理解するためには、こうしたトランスロケータ自身の動的性質を詳しく解析することが重要であることがわかってきた。したがって、機能状態のトランスロケータの構造情報を取得する（スナップショットを撮る）新しい手法が重要となった。そこで(7)トランスロケータ自身の動的性質を解析する実験系と手法を開発する、こともめざした。

トランスロケータが動的な複合体であることは、安定な複合体を単離することが困難であること、したがって複合体全体の構造解析が極めて難しいことも意味する。そこで、構造解明においては、とりあえずトランスロケータ構成因子（あるいはその機能単位）レベルでの大量調製と NMR および X 線による構造決定をめざすとともに、サブユニット間相互作用をできるだけ高い空間分解能で解析することを目標として設定した。以上の目標・計画変更に伴い、部位特異的光架橋法の重要性がますます高まり、*in vitro* だけでなく、*in vivo* への適用も開始することとした。

## (2)実施体制



### 3 研究実施内容及び成果

#### 3.1 ミトコンドリアタンパク質トランスロケータの作動原理の解明 (名古屋大学 遠藤グループ)

##### (1) 研究実施内容及び成果

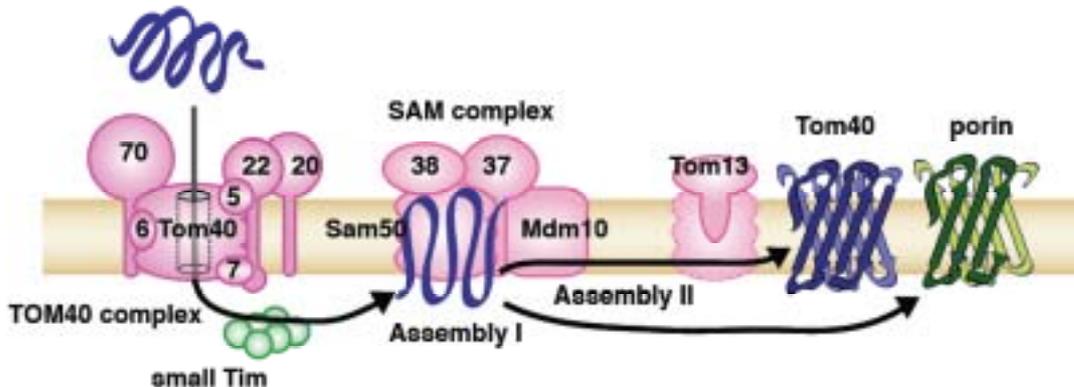
##### (1)-1 新規トランスロケータ構成因子の発見

ミトコンドリアへのタンパク質移行を担うトランスロケータ構成因子の解析は酵母を中心に精力的に進められ、2000年代はじめにはほぼすべての因子が同定されたと考えられていた。すなわち、外膜のトランスロケータとして TOM40 複合体、内膜のトランスロケータとして TIM23 複合体と TIM22 複合体、そして膜間部の補助因子として small Tim タンパク質が、ミトコンドリアタンパク質のミトコンドリアへの取り込みとミトコンドリア内各区画への仕分けを担うと考えられ、この分野の研究はトランスロケータ構成因子の同定から、各トランスロケータの機能解明へと展開するものと考えられていた。ところが遠藤らは2002年、ミトコンドリア内膜の TIM23 複合体の新規構成因子として Tim50 を発見した。この因子は、TIM23 複合体への結合が弱く、従来の生化学的解析では見落とされていたものと考えられる。にもかかわらず、Tim50 は TIM23 複合体の機能に必須であったことから、関係する研究者たちに大きなインパクトを与えることとなった。そして Tim50 の発見を契機として、いままで見落とされている可能性がある、トランスロケータを構成する未同定の因子の再検索がスタートした。

われわれは出芽酵母のゲノム情報をフルに利用し、2004年以降、新規因子を次々に発見した。すなわち、ミトコンドリアへのタンパク質移行を担うタンパク質は酵母の増殖に必須なものが多いという事実に基づき、酵母の増殖に必須なタンパク質 (網羅的解析結果が公開されている) のうち、ミトコンドリアに局在化し、かつ機能未知のものを標的として、集中的な解析を行い (一次スクリーニングとして、発現を抑制するとミトコンドリアタンパク質前駆体が蓄積するかどうかを調べる)、新規因子として Tom38, Tom13, Tim40, Tim15, Tam41 の5種類のタンパク質を発見した。このうち、Tom38, Tom13, Tim40 はタンパク質のミトコンドリア移行に直接関わる因子であり、Tim15 と Tam41 はミトコンドリアタンパク質移行システムの機能維持に関わる因子であることが明らかになった。

##### 【Tom38 と Tom13】(J. Cell Biol., 2004)

Tom38 と Tom13 はミトコンドリア外膜のタンパク質で、バレル型膜タンパク質の外膜への組み込みに関わる新因子である。これまで膜貫通ヘリックスをもつ膜タンパク質の膜への組み込みについては研究が盛んに行われてきたが、バレル型膜タンパク質については知見が少なく、最近になってやっとわれわれを含む複数のグループにより、専用のトランスロケータが関わるということが明らかになってきた。Tom38 はバレル型膜タンパク質専用トランスロケータ SAM/TOB 複合体構成因子であるが、Tom13 は既存の外膜トランスロケータ構成因子のいずれとの相互作用も見いだされず、新規のトランスロケータ複合体をつく



っていることが考えられる。Tom38 は SAM/TOB 複合体の必須因子として、バレル型膜

タンパク質と SAM/TOB 複合体の相互作用に必要であり, Tom38 が欠損すると両者の複合体が形成されない。一方 Tom13 は, パレル型膜タンパク質の中でも特に Tom40 専用のアセンブリー因子らしく, SAM/TOB 複合体から最終 TOM40 複合体への移行のステップに必要であるらしい。

【Tim40】( J. Biol. Chem., 2004 )

Tim40 は膜間部にドメインを持ち, 既知の内膜トランスロケータには含まれない, 内膜の新因子である。膜間部の small Tim 等, 可溶性低分子量タンパク質と一過的に分子間ジスルフィド結合を介した複合体をつくることにより, これらのタンパク質の外膜透過を駆動する。さらに, これまではミトコンドリア内はサイトゾルと同様還元的環境下であり, ここではタンパク質のジスルフィド結合は形成されないと考えられていたが, 最近ミトコンドリア膜間部ではジスルフィド結合が形成されること, このジスルフィド結合に Tim40 が関わるが見いだされている。しかし Tim40 自身がどのような組み合わせのジスルフィド結合を持つのか, どのシステイン残基が基質の酸化に直接関与するのか等は全く不明である。現在, Tim40 のジスルフィド結合形成に関わるコアダメインについて, システイン残基の酸化状態, ジスルフィド結合のペアの決定も含めて, 立体構造を NMR で解析中である。

(1)-2 トランスロケータの機能維持を担う因子の発見

【Tim15】( FEBS Lett., 2005 )

マトリクスの新因子 Tim15 は zinc finger ドメインを有し, 内膜マトリクス側の表在性膜タンパク質である。既知のトランスロケータには含まれないが, 発現を抑制すると多くのタンパク質の内膜透過に欠損が生じる。マトリクスでタンパク質の高次構造形成や前駆体の内膜透過に関わる分子シャペロン Hsp70 との生化学的, 遺伝学的相互作用が見いだされることから, Tim15 が Hsp70 の補助因子として働く可能性が考えられた。一つの可能性は Hsp70 のパートナータンパク質である J タンパク質の zinc finger ドメイン(前駆体の認識, 受け渡しを担う)として機能することであるが, Hsp70 のシャペロンとして働く可能性も指摘されている。後述するように, Tim15 の立体構造に基づいた機能解析は, 後者のモデルを支持している(後述)。

【Tam41】( J. Cell Biol., 2006 )

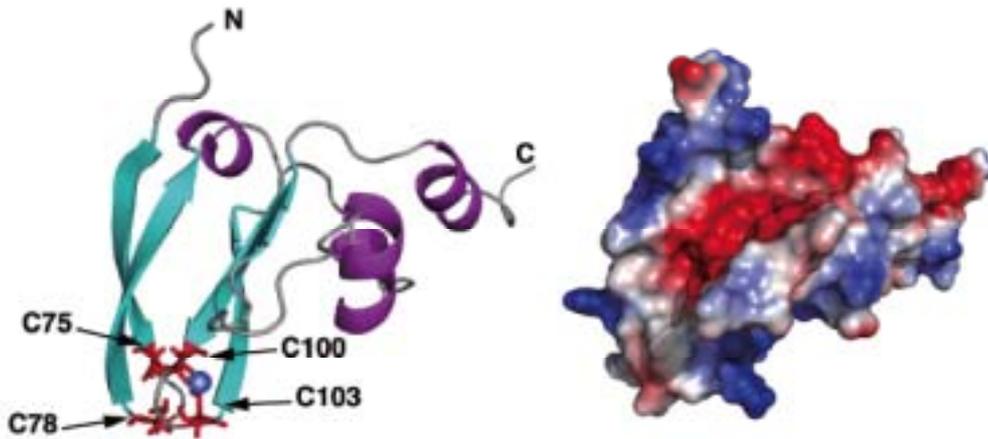
Tam41 はミトコンドリア内膜マトリクス側の表在性膜タンパク質で, その遺伝子破壊株では, 内膜のトランスロケータ TIM23 複合体を経由するタンパク質のミトコンドリア移行に欠損が生じる。これまで知られているマトリクスのトランスロケータ因子は, すべて mtHsp70 のモータ機能を介してタンパク質の内膜透過に関わるものであったが, Tam41 が機能欠損すると, *in vivo* および *in vitro* で内膜透過だけでなく, TIM23 複合体を経由した内膜・膜間部へのタンパク質移行にも欠損が生じる。Tam41 の機能欠損は, モータ因子 Tim16 の TIM23 複合体へのアセンブリー効率を下げ, TIM23 複合体の見かけの分子量も減少させることから, Tam41 は mtHsp70 のモータ機能ではなく, 内膜のトランスロケータ TIM23 複合体の機能的アセンブリーを維持するのに必要であると考えられる。

Tam41 の発見は, 一般に複雑な膜タンパク質複合体は機能維持に Tam41 のようなメンテナンス因子を必要とする可能性を示唆する。実際最近, ATP 合成酵素や呼吸鎖複合体のような複雑な膜タンパク質複合体の生合成に, 様々なアセンブリー因子に関わるということが明らかになりつつあり, こうした因子は機能維持にも関わる可能性がある。複雑な膜タンパク質複合体では, コアサブユニットを除く多くのサブユニットが互いに交換していることが明らかになってきており, Tam41 などの因子は, 一時的に複合体を離れたサブユニットの再アセンブリーを助けることによって複合体の機能維持を担うのかもしれない。Tam41 は, 膜タンパク質複合体機能発現および機能維持を担う新しい因子群の存在と重要性を示唆す

る因子といえる。

(1)-3 Tim15 の NMR 構造決定と機能解析 (EMBO Rep., 2007)

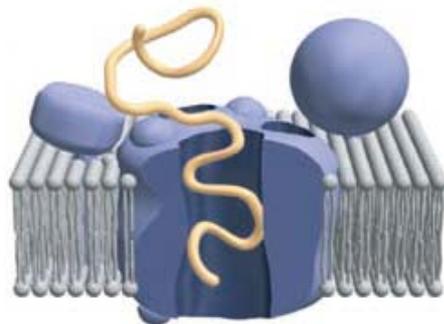
ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 複合体のモータ機能を担う mtHsp70 の補助因子 Tim15 の機能を明らかにするために、Tim15 のコアドメインを大腸菌内で発現・調製し、その NMR 構造を決定した。決定された NMR 構造は L 字型で、表面電荷の分布は不均等であった。そこで電荷分布をもとに様々な残基を置換し、変異 Tim15 のみを発現する酵母株の増殖を調べることにより、Tim15 の機能に必須のアミノ酸残基を同定した。さらに、mtHsp70 の溶解度 (Tim15 が発現しないと mtHsp70 は凝集する)、大腸菌細胞内で変異 Tim15 を発現した時の mtHsp70 の溶解度を調べたところ、これらのアミノ酸残基が置換すると、mtHsp70 の溶解度も低下することが分かった。したがって、Tim15 の機能は mtHsp70 との相互作用と関連し、その相互作用は mtHsp70 を可溶性に保つ働き (Tim15 は分子シャペロン mtHsp70 のシャペロン) があることが分かった。しかし一方で mtHsp70 のヌクレオチド交換という機能をもつ Yge1p も Tim15 と同様 mtHsp70 を可溶性に保てることも分かり、Tim15 の本来の機能が mtHsp70 を可溶性に保つシャペロン機能にあるのか、それ以外の重要な機能もあるのかは不明である。



(1)-4 トランスロケータのチャンネルのシャペロン機能の発見 (Nature Struct Biol, 2003)

前駆体タンパク質はトランスロケータの孔 (チャンネル) を通って生体膜を通過する。立体構造がほどけたポリペプチド鎖がヒモのように通る孔とは、どんな性質を持っているのだろうか。孔を通り抜けるポリペプチド鎖が孔の内壁にベタベタとくっついてしまうと孔が詰まるので、ほどけたポリペプチド鎖は孔の内壁と強く相互作用しないことが期待される。実際、テフロンのようにツルツルの孔として、リボソームのポリペプチド鎖排出トンネルがある。

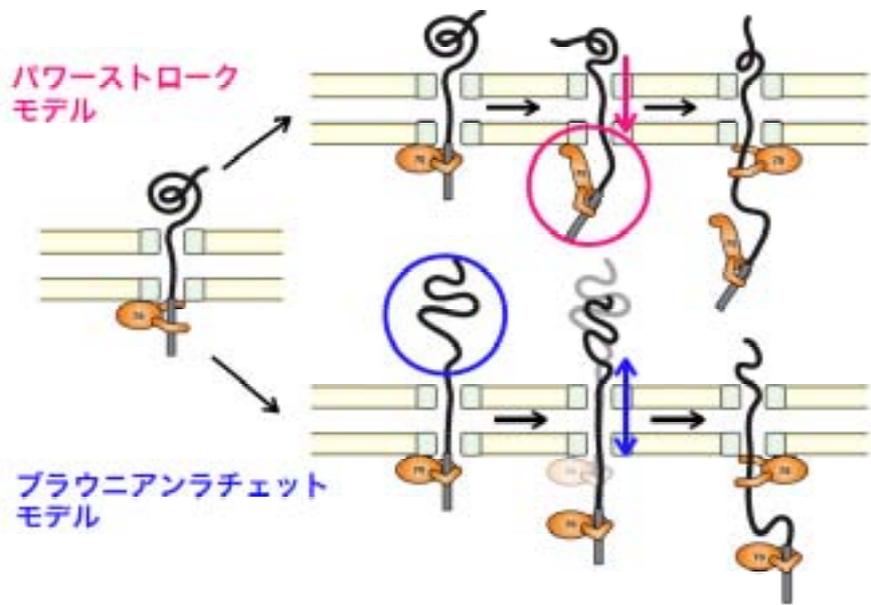
部位特異的光架橋反応 (任意の位置に光架橋性非天然アミノ酸を導入したタンパク質を *in vitro* で合成し、他のタンパク質との相互作用をアミノ酸残基レベルの空間分解能で解析できる手法) で、トランスロケータの孔を通過中の前駆体とミトコンドリア外膜トランスロケータ (TOM40 複合体) の空間的位置関係を解析したところ、高次構造を形成できないポリペプチド鎖は 100 残基近くが



孔の中に留まることがわかった（本来は最低 30 残基あれば孔は貫通できる）。すなわち、タンパク質のヒモが自分で折りたたまれて立体構造を作れる場合は孔から出て行くが、きちんと折りたためないうちは孔の中に留まるらしい。さらに Tom40 の孔は変性タンパクに弱く結合し、変性タンパクの凝集を防ぐことも明らかになった。こうした Tom40 の性質は、細胞内でタンパク質の凝集を防ぎ、立体構造の形成を助ける分子シャペロンに似ている。ミトコンドリアトランスロケータ TOM40 複合体の孔は、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、保護することが考えられる。したがってミトコンドリアのトランスロケータの孔は前駆体を通すための単なるツルツルの孔ではなく、むしろ積極的に前駆体と相互作用し、介護する機能をもっているのであろう。これはタンパク質が通る孔の概念を書き換えるものである。

(1)-5 Hsp70 がブラウニアンラチェットによりタンパク質をほどくことを証明

トランスロケータの孔は 20-30 残基なので、前駆体タンパク質は立体構造をアンフォールドしないと孔を通過できない。そこでトランスロケータは前駆体を積極的にアンフォールドして、孔を通過させねばならない。mtHsp70 は基質前駆体を実質的に引っ張り、マトリクスに入ってきたほどけたポリペプチド鎖に次々に結合していくが、逆にトランスロケータをポリペプチド鎖上を進む分子モーターとしてとらえることもできる。



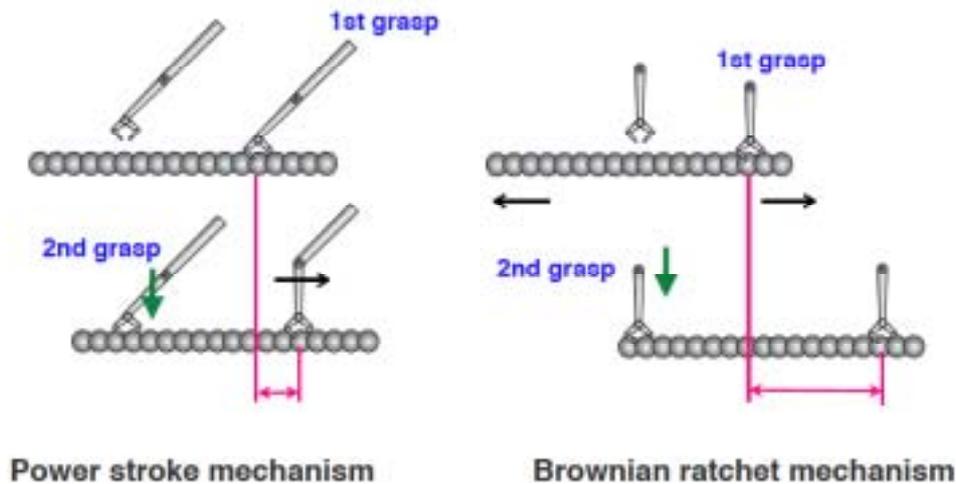
前駆体 N 末端に付加したプレ配列が十分に長いときは、もともとほどけているプレ配列がトランスロケータを通過してマトリクスに達し、これにマトリクスの Hsp70 ( mtHsp70 ) が結合して、プレ配列を引っ張る。この場合の mtHsp70 による前駆体アンフォールディングのメカニズムについては、ブラウニアンラチェットとパワーストロークという二つのモデルがあり、どちらが正しいかについて長く論争が続いてきた。

パワーストロークモデルでは、mtHsp70 が ATP 加水分解にともないコンホメーション変化を起こし、機械的に前駆体を引っ張り、サイトゾル側の成熟体ドメインをアンフォールドする。一方ブラウニアンラチェットモデルでは、サイトゾル側の成熟体ドメインの N 端部分が自発的にアンフォールドし、ほどけたセグメントがブラウン運動でトランスロケータチャネルを内部に移動する。通常はやはりブラウン運動でチャネルを逆戻りして、成熟体ドメインがリフォールディングするはずであるが、マトリクス側に移動したセグメントに ( 第二の ) mtHsp70 が結合すれば、ほどけた部分の逆戻りとリフォールディングが妨げられ、結果として成熟体ドメイン全体のアンフォールディングが引き起こされる。

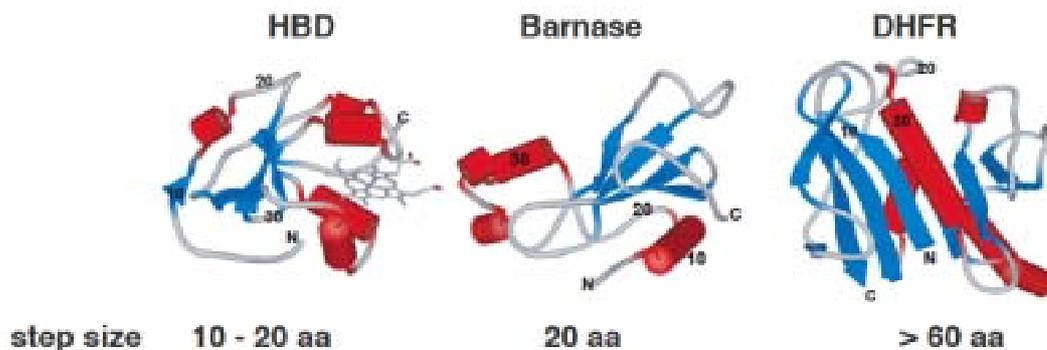
この二つのモデルのどちらが正しいかは、どうすれば分かるか？ mtHsp70 をほどけたポリペプチド鎖上を進む分子モーターとしてとらえたとき、そのステップサイズ ( ATP 一分子の加水分解に伴い進む距離 ) が分かれば、この問題解決のヒントが得られるはずである。す

なわち、パワーストロークモデルでは、ステップサイズは mtHsp70 のコンホメーション変化の大きさに対応し、したがってどの前駆体タンパク質（の成熟体ドメイン）においてもほぼ同じ値になると考えられる。一方ブラウニアンラチェットモデルでは、前駆体の成熟体ドメインが異なれば、一時的な局所的アンフォールディングの頻度や大きさも異なるであろうから、ステップサイズは前駆体によって異なると考えられる。

mtHsp70 のステップサイズを測定するために、プレ配列と成熟体ドメインの間に mtHsp70



が結合できない Gly リピート配列を挿入した融合タンパク質を作成し、in vitro でミトコンドリアへのインポート実験を行う。Gly リピート配列の長さを変えてミトコンドリアへの取り込み速度を比較してステップサイズを見積もったところ、ステップサイズは前駆体によって異なること、成熟体ドメインが DHFR の場合はステップサイズは 60 アミノ酸残基(200)以上になることがわかった。mtHsp70 のコンホメーション変化ではたかだか 70 程度のステップサイズしか生み出せず、ブラウニアンラチェットモデルが正しいことが示唆された。常に激しい溶媒分子の衝突にさらされてブラウン運動が起こっているミクロの世界では、正確な機械的運動に基づくパワーストロークよりは、揺らぎによる運動の一部を取り出して分子を動かすブラウニアンラチェットの方が、効率的かつ省エネルギー的であると言えるのかもしれない。また、インポートモータ mtHsp70 のステップサイズの測定により、成熟体ドメインの構造的揺らぎに関する情報（頻度や大きさ）が得られることも重要と考えられる。

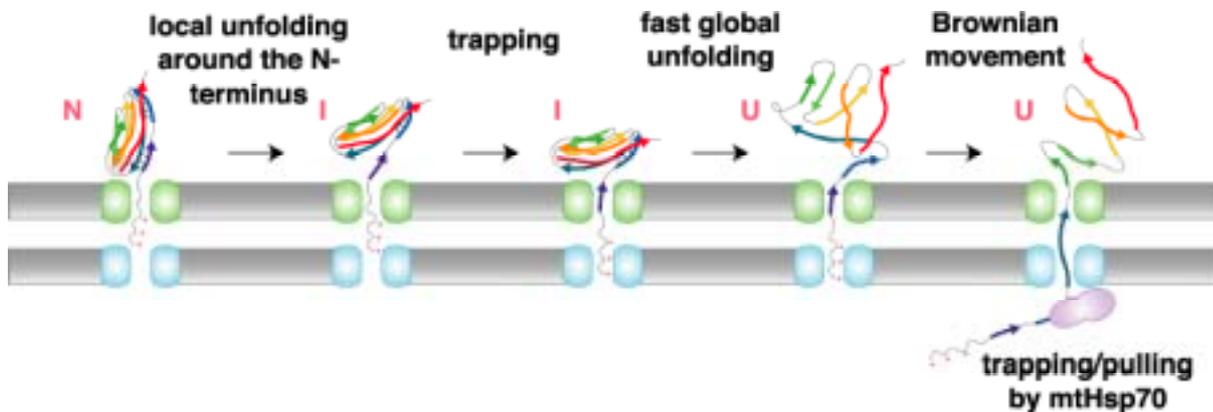


(1)-6 トランスロケータが Hsp70 を使わずにタンパク質をほどく仕組みの解明 (Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 2005)

基質前駆体のプレ配列が短い場合は、mtHsp70 がプレ配列に結合して引っ張ることができないため、別の機構で成熟体ドメインがまずアンフォールドしなければならない。そこで成熟体ドメインとして筋タンパク質のタイチンのドメインを用い、原子間力顕微鏡による力学的アンフォールディング（タンパクの N 端と C 端を力学的に引っ張って変性させる）の専門家 Julio Fernandez と共同研究を行い、様々な titin 変異体について、ミトコンドリアへのインポート速度と力学的安定性を比較した。

titinI27 の変異の膜透過速度に対する影響は、N 末端から取り込ませた場合と C 末端から取り込ませた場合とで、大きく異なっていた。C 末端からの膜透過に対する変異の効果は、AFM による力学的変性に対する安定性と良い相関が見られ、ミトコンドリアへの取り込みに伴うアンフォールディングと力学的変性のアンフォールディングが良く似ていることが示唆された。すなわち、C 末端付近の構造がほどけると一気に分子全体のアンフォールディングが起こり、膜透過速度に N 末端付近を安定化する変異の影響は見られなかった。一方、N 末端からの膜透過においては、長いミトコンドリア行きシグナルを持つ場合に限らず短いシグナルを持つ場合でも、titinI27 の N 末端付近の変異の影響は受けるものの、力学的安定性には影響を与える C 末端付近の変異の影響は見られなかった。AFM による延伸実験では、N 末端部分がまずほどけても、C 末端を含む残りの部分の構造は安定であり、さらに延伸されなければ分子全体のアンフォールディングは起こらない。一方 N 末端からのミトコンドリアへの取り込みにおいては、N 末端部分がほどければ、C 末端を含む残りの部分の構造が不安定化し、その結果 C 末端側の変異の影響が見られないと考えられた。すなわち、ミトコンドリア膜透過装置（たとえば Tom40 のチャネル）は、ミトコンドリア行きシグナル近傍が部分的にほどけた膜透過中間体に相互作用し、その安定性を減少させることによって分子全体の効率的なアンフォールディングを引き起こすことが明らかになった。



#### (1)-7 ブラウニアンラチェットによるアンフォールディング効率の上限を解明

一般にミトコンドリアへのタンパク質移行の律速段階は、前駆体（の成熟体ドメイン）のアンフォールディングであり、ブラウニアンラチェットが正しいのであれば、成熟体ドメインの局所的アンフォールディングはインポートよりも速くなくてはならない。しかしこれまで、成熟体部分の局所的アンフォールディングがインポートより速く起こり得る、という直接的な証明はなかった。そこでわれわれは、短いプレ配列をもつ前駆体のインポートが、長いプレ配列をもち mtHsp70 により効率的に行われるインポートと同程度に速く起こり得るかどうか、検討することにした。そのためにはまず、短いプレ配列をもつ前駆体のアンフォールディングが内膜の膜電位によるパワーstrokeによらないことを証明する必要があった。膜電位によるパワーstrokeでなければ、短いプレ配列は成熟体部分のアンフォールディングなしには mtHsp70 に結合できず、したがってブラウニアンラチ

エットがアンフォールディングを引き起こす唯一のメカニズムになるはずだからである。

そこでモデル前駆体としてシトクロム  $b_2$  プレ配列の前半と titin (筋タンパク質のドメイン) の融合タンパク質を用いた。シトクロム  $b_2$  プレ配列の前半はマトリクス移行シグナルとして機能するが、プレ配列としては例外的に負電荷をもつ (Asp15)。この Asp15 を電荷を持たない Leu に置換するとインポート速度が 20 倍以上速くなり、長いプレ配列をもつ前駆体と同程度になることから、Matoushek らは、内膜膜電位によるパワーストローキが成熟体部分のアンフォールディングを引き起こすと考えた。しかしわれわれは、Asp15 を Leu と同じように電荷を持たない Ala に置換すると Leu に置換した場合よりもインポート効率が下がること、Gly に置換するとさらにインポート速度が低下することを見出した。また Asp15 を正電荷をもつ Lys15 に置換しても、インポート速度は Leu15 への置換体よりも遅かった (Ala への置換と同程度)。これらの実験結果は、短いプレ配列、すなわちシトクロム  $b_2$  プレ配列の前半をもつ融合タンパク質のインポート効率は、プレ配列と膜電位の相互作用によるのではなく、むしろ mtHsp70 との相互作用に依存するものと考えられた。すなわち titin 部分が一時的にアンフォールドしても、ほどけた分子種を mtHsp70 のプレ配列への結合でトラップできなければ、titin 部分全体のアンフォールディングは引き起こせないということである。インポート効率の順番は mtHsp70 の基質結合の親和性の順番と一致し、前駆体プレ配列のアミノ酸配列が適切であれば、ブラウニアンラチェットにより mtHsp70 が効率良く成熟体ドメインのアンフォールディングを引き起こせることが、はじめて証明された。

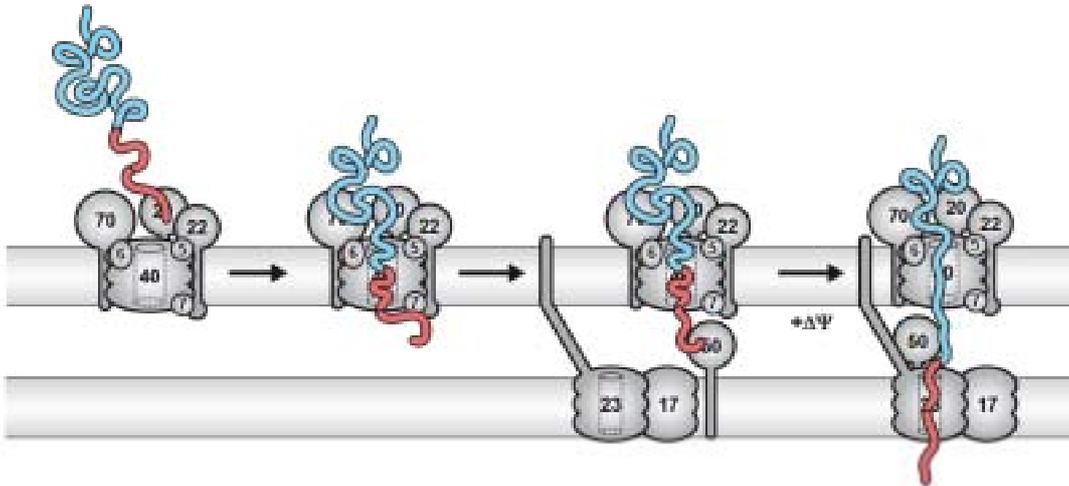
#### (1)-8 ミトコンドリア外膜受容体の新機能の発見

トランスロケータは前駆体タンパク質の行き先シグナルを認識し、正しい基質のみを膜透過させる。外膜トランスロケータのプレ配列受容体 Tom20 とプレ配列の相互作用を NMR で解析したところ、意外にも長いプレ配列 (pSu9) には二ヶ所 Tom20 認識部位があることが分かった。なぜ一つのプレ配列に Tom20 認識部位が二つも必要なのか? この問いに答えるために、N 末端側 Tom20 認識部位 (Su9N)、C 末端側 Tom20 認識部位 (Su9C)、全く関係のない配列を各々組み合わせた配列を付加したモデル前駆体を用いて、ミトコンドリアへの取り込みと内膜ベシクルへの取り込みを調べた。長いプレ配列の N 端側に Tom20 認識配列、すなわち Su9N も Su9C もないとミトコンドリアへの取り込みが起こらず、Su9C を N 端側に移動させても取り込みは起こるが効率が下がる。また、N 端側に Su9N があるとき、さらに C 端側も Su9N があると、ミトコンドリアへの取り込み効率も内膜ベシクルへの取り込み効率も上がるが、N 端側の Su9N に加えて C 末端側に Su9C があると、内膜ベシクルへの取り込み効率は変わらないがミトコンドリアへの取り込み効率は上がる。したがって C 末端側にある Su9C は内膜透過ではなく、外膜透過の効率を高めていることが分かる。そこで、さらに外膜への結合と外膜に結合した状態からのチェイス反応を調べたところ、Su9C は外膜への結合効率を高めるが、その後のチェイス反応の効率には影響を与えないことが分かった。すなわち、N 端側 Tom20 認識部位は行き先シグナルとして Tom20 に認識されるが、C 端側認識部位はその次のステップで Tom20 と相互作用することにより、前駆体の外膜透過装置への結合効率をあげ、そのことによって外膜透過の効率を高める役割があることが分かった。

ミトコンドリアタンパク質のプレ配列を統計的に調べると、30% 以上は、長さが 40 残基以上あり、しかもそれらの多くは Tom20 結合に必要なアミノ酸配列モチーフを複数含む。したがって長いプレ配列は、ミトコンドリアへの輸送の特異性に加えて、ミトコンドリアへの輸送の効率をあげるよう、進化の過程で最適化されてきたことが考えられる。逆に言えば、プレ配列中の行き先シグナルの認識を担うプレ配列受容体 Tom20 が、進化の過程で外膜透過の効率をあげるよう調整されてきた可能性が示唆された

### (1)-9 ミトコンドリア内膜受容体の発見

ミトコンドリアのマトリクスへの効率的なタンパク質移行においては、外膜透過と内膜透過が共役することが重要である。この共役に関わる因子は内膜 TIM23 複合体の構成因子 Tim50 と考えられていたが、その具体的な機構は不明であった。今回 Tim50 の膜間部ドメインとミトコンドリア移行シグナルに対応するペプチドの相互作用を NMR で解析したところ、Tim50 はミトコンドリア移行シグナルを認識する受容体として働くことが明らかになった。すなわち、<sup>15</sup>N 標識したプレ配列に標識していない Tim50 の膜間部ドメインを加えていったところ、プレ配列の [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N]HSQC スペクトルの一部のシグナルが大きく変化した。しかもシグナルの変化は NMR の時間スケールで遅い交換にあたり、プレ配列の Tim50 への結合・解離が遅いことがわかった。すでにわれわれが明らかにしているプレ配列と外膜受容体 Tom20 の相互作用においては、結合・解離速度は NMR の時間スケールで速い交換に



あたる。したがって、Tim50 の方が Tom20 よりもプレ配列との相互作用が強いことが考えられる。このことは、プレ配列の外膜受容体 Tom20 から内膜受容体 Tim50 への効率的移行をよく説明できる。すなわち、長い間謎であった外膜と内膜という2つの膜透過の共役の仕組みが、初めて解明されたことになる。また、外膜だけでなく、内膜のトランスロケータも前駆体のミトコンドリア行きシグナルを認識することで、前駆体の行き先エラーを少なくするという、特異性向上の意義があることも明らかになった。

### (1)-10 ミトコンドリア外膜 バレル型膜タンパク質アセンブリーにおける経路仕分け機構の解明

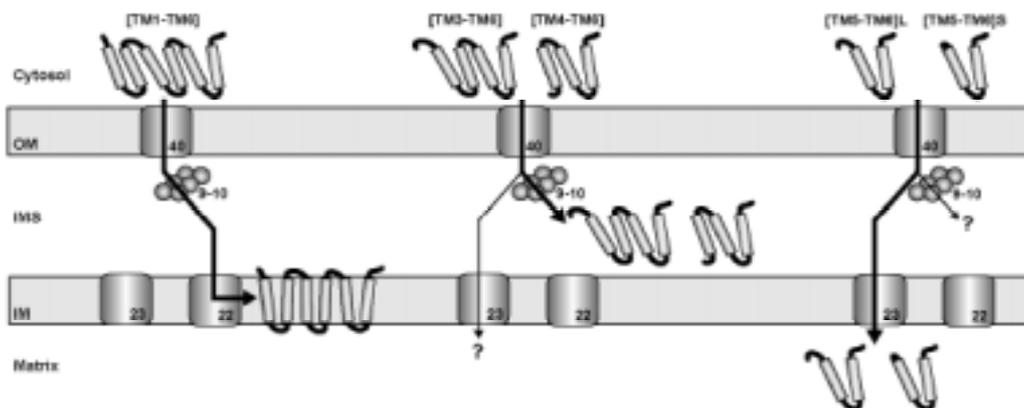
Tom40 やポリンなど、ミトコンドリア外膜の バレル型膜タンパク質は、外膜の TOM40 複合体を通過していったん膜間部に移行した後、外膜の SAM/TOB 複合体を介して外膜に組み込まれると考えられている。さらに、この経路には膜間部の small Tim タンパク質も関わるが見いだされている。しかし TOM40 複合体経路通過後、バレル型膜タンパク質のアセンブリー経路が、どのような仕組みでマトリクスや内膜に向かう経路から分岐するのか、small Tim タンパク質の具体的機能は何かなど、まだ不明な部分が多い。

そこでマトリクスや内膜、膜間部に移行する前駆体部分を Tom40 の N 端に付加し、ミトコンドリアへのインポートに際してどちらの仕分けシグナルが優勢になるかを解析した。マトリクス行きシグナルは、Tom40 部分の外膜への経路より優勢であるが、Tom40 部分が内膜を通過できず、中間体として留まる。一方内膜行きシグナルの場合は、Tom40 部分は SAM/TOB 複合体と相互作用するステップまでは進めるが、その先のステップに進めなくなる。内膜行きシグナルが切断される膜間部行きシグナルの場合は、Tom40 部分は正常に外膜に組み込まれる。また small Tim タンパク質は Tom40 部分の外膜透過を駆動する機能と、その後 SAM/TOB 複合体に正しく受け渡す機能の、2つの役割があることも明らかになった。

ミトコンドリア内では、目的区画へのシグナルの優位性に基づく各トランスロケータ間での前駆体タンパク質の受け渡しにより、正しい仕分けが実現していると考えられる。

(1)-11 内膜とマトリクスへの仕分けの仕組みを解明 (J. Biol. Chem., 2005)

ミトコンドリアのマトリクスや内膜のタンパク質の多くは、外膜の TOM40 複合体を通過した後、TIM23 複合体を経由してマトリクスへ、TIM23 複合体または TIM22 複合体を経由して内膜に移行する。マトリクスと内膜への移行経路の分岐を制御するシグナルとその認識機構を理解するために、内膜の複数回膜貫通タンパク質 PiC (リン酸キャリア) の各種欠失変異体を作成し、ミトコンドリアへの移行経路を調べた。野生型 PiC は、TOM 複合体通過後、内膜の TIM22 複合体に移行し、TIM22 複合体によって内膜に組み込まれる。しかし PiC の欠失変異体の中には TIM22 経路ではなく、TIM23 経路によりマトリクスにまで送られて仕分けられるものがあった。このことは、PiC は TIM23 経路に仕分けられる隠れた (cryptic) シグナルを有することを示しており、TIM22 経路と TIM23 経路の間の仕分け機構が従来考えられていたより複雑であることを示している。



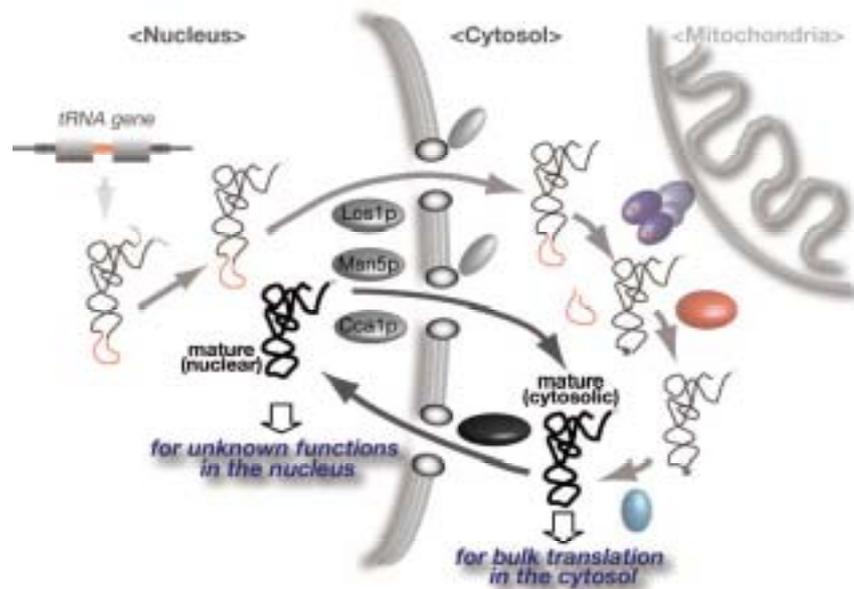
(1)-12 Tim23 がミトコンドリア内タンパク質移行で果たす複合的機能の発見

ミトコンドリアのマトリクスや内膜へ移行するプレ配列を有する前駆体タンパク質は外膜トランスロケータ TOM40 複合体によって外膜を通過後、内膜のトランスロケータ TIM23 複合体により内膜を通過、または内膜に組み込まれる。TIM23 複合体サブユニット Tim23 と Tim50 はともに膜間部にドメインを持ち、前駆体の受容体として働く機能が見いだされている (1)-9)。Tim23 および Tim50 の膜間部ドメインはコイルドコイルを作って相互作用する可能性があるため、両者のコイルドコイル領域に変異をいれて両者の相互作用を壊すような変異体を多数作成した。実際そのうちのいくつかは Tim23-Tim50 相互作用が低下し、TIM23 複合体の基質の内膜透過や内膜への組み込み速度が低下した。マトリクスタンパク質と内膜タンパク質の両方に影響を与える変異は、Tim23-Tim50 の受容体機能に影響を与えたものと考えられるが、マトリクスタンパク質のみに影響を与えたものは、内膜の反対側の TIM23 複合体のモータ機能に欠陥が生じたものと考えられた。したがって Tim23-Tim50 の膜間部ドメインは、受容体としての機能だけでなく、マトリクス側でのモータ機能にも関わる、多機能因子として機能することがわかった。トランスロケータの構成因子の特定ドメインが特定の役割のみを担うのではなく、膜透過過程の様々なステップに同時に関わるということは、トランスロケータという分子機械の作動原理を考えるうえで重要な知見であると考えられる。

(1)-13 RNA にも交通管制が必要であることを発見 (Science., 2005)

タンパク質はサイトゾルで合成されてから（あるいは合成されつつ）、タンパク質トランスロケータによって目的細胞内区画に移行する。さらにいったん成熟したタンパク質が、何らかのシグナルにより別な区画に移動して機能を変換したり、不良品と見なされた後、別な場所に移行して分解されるケースもある。一方RNAはタンパク質と異なり核内で転写、加工された後サイトゾルに移行し、そこで機能を果たして終わりという単純な動態が信じられてきた。われわれは新しい可能性として、RNAもタンパク質と同様交通と機能が複雑に管制されているのではないかと考え、tRNAの交通に関する研究を、最近開始した。まず従来のモデルとは異なり、tRNAは核内で加工が行われるのではなく、サイトゾルに移行した後ミトコンドリアで加工されて初めて成熟体になることが分かった。さらに驚いたことに、

ヘテロカリオンアッセイという手法（細胞を融合させて二つの核をもつ細胞をつくり、一方の核でのみ転写された異種tRNAがもう一方の核へ移動するかどうか蛍光顕微鏡で観察する）を用いた解析から、いったん成熟体となったtRNAがサイトゾルから再び核に戻ることを



見出した。細胞は定期的にtRNAをサイトゾルから核に再回収してtRNAの品質を検査し、異常がなければ再びサイトゾルに送り出す、という品質管理を行っているのかもしれない。これは、「タンパク質のみならずRNAも細胞内での交通が複雑に管制されている」という意味で、パラダイムシフトをもたらす発見である。tRNAの管制に関わる未知のトランスロケータの探索とキャラクター化が今後の課題である。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、ミトコンドリアを例にとり、トランスロケータによる膜を舞台とするタンパク質の配置のメカニズムの解明をめざした。その過程で、トランスロケータを構成する新因子やトランスロケータの機能に関わる新因子を次々に発見し、ミトコンドリアのトランスロケータ、そしてタンパク質のミトコンドリアへの移行経路が、従来考えられていたよりもはるかに複雑であることが明らかになった。しかしそれでも、限られた種類のトランスロケータによる限定された経路で、1000~2000種類におよぶミトコンドリアタンパク質の交通が正確に管制されていることは、驚くべきことである。新因子は外膜パレル型膜タンパク質のアセンブリーや膜間部でのジスルフィド結合形成という新経路に関わるもの、さらにトランスロケータそのものの機能維持に関わるものであり、これらの因子の発見により、トランスロケータシステム概念と機能は大きく拡大した。こうした新概念は、今後人為的にトランスロケータを改変したり、それらを模した装置やシステムを設計していくうえで、重要な指針を与えるものと考えられる。

また、これまで十分に分かっていなかった、行き先シグナルの実体とその認識機構につ

いても、格段に理解が深まった。すなわち、プレ配列が外膜の受容体 Tom20 (トランスロケータ TOM40 複合体のレセプターサブユニット) だけでなく、内膜で Tim50 (トランスロケータ TIM23 複合体のサブユニット) によって認識されることを、NMR により直接的に示した。これは、プレ配列中には、行き先シグナルとして複数のシグナルが多重的に書き込まれており、ミトコンドリアへの移行過程で複数のレセプター因子によって多重的に認識されるという「多重シグナルモデル」を支持する結果である。今後、多重シグナルをひとつずつ明らかにしていくことにより、行き先シグナルの真の姿が見えてくるであろうこと、そのときはじめてタンパク質の局在部位の正確な予測への道がひらけることが期待される。また今回、プレ配列中に二ヶ所 Tom20 認識部位がある例が見つかり、しかも二つ目の認識部位と Tom20 の相互作用は、行き先シグナルの認識ではなく、外膜透過の効率を上げる働きがあることが分かったことも興味深い。行き先シグナルおよびトランスロケータのレセプターには複数の機能があることを示すこの発見は、従来の行き先シグナルの概念を書き換える物である。行き先シグナルとその認識に関わる知見は、異種細胞内における組換えタンパク質発現技術の質を大きく変えることが期待される。すなわち、組換えタンパク質を特定のオルガネラの特定の区画に、精密かつ自在に送り込むことが可能となる。さらに膜タンパク質を特定の配向性でオルガネラ膜や細胞膜に組込むことも可能となる。こうした技術の進歩は、オルガネラ機能や細胞表層機能のキメ細かい制御を可能とするであろう。

今回、ミトコンドリアのトランスロケータのモータ因子である mtHsp70 がブラウニアンラチェットで働くことを明らかにし、長年の論争に決着をつけることができた。ミクロの世界で物を動かすにはパワーストロークよりもブラウニアンラチェットの方が、効率的であるのかもしれない。今後ナノスケールで分子機械を設計していくうえで、ブラウニアンラチェットをいかにうまく利用していくかが重要な課題となることを示唆していると思われる。

### 3.2 小胞体トランスロケータの作動原理の解明(九州大学~兵庫県立大学 阪口グループ)

#### (1)研究実施内容及び成果

##### (1)-1-a 大きなドメインの制御可能で高効率な膜透過実験系の構築(EMBO J., 2005)

トランスロケータ作動原理を明らかにするには、膜透過やトポロジー形成の過程を、制御し、同調して計測できる実験系が必要である。そこでわれわれが独自に発見し解析を続けてきた1型シグナルアンカー配列(Type I signal-anchor sequence; SA-Iと略)による小胞体トランスロケータにおけるアミノ末端ドメイン(N-ドメイン)の膜透過過程を探求した。膜透過が物理計測可能な程度持続し、かつ膜透過の停止と再開が制御可能で、少量の膜標品で実現可能な高効率膜透過実験系を設定できた。

ポリペプチド鎖の動きをある程度持続的に測定するためには、ある程度の長いドメインであること、透過を制御し同調的に計測するためには、一度膜透過を停止させた後、任意のタイミングで効率良く膜透過反応を再開できることが必要である。アミノ末端ドメインを膜透過に導くシグナル配列として、マウスの synaptotagmin2 (SytII) の SA-I を使用し、透過する大きな N-ドメインとして、マウスジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を使用した。また、タンパク質合成系にはウサギ網状赤血球ライセートを、膜としてはイヌ膵臓から高度に精製した粗面小胞体膜(RM)を使用した。DHFR-SytII 融合タンパク質のコード領域内で切断した mRNA を翻訳反応に用いると、RNA の 3'-末端まで進んだ所で翻訳が停止し、ポリペプチド鎖はペプチジル tRNA のままりボソーム内に保持されてリボソーム新生鎖複合体(RNC)を形成する。RNC では、リボソームがトランスロケータと複合体を形成したままとなり、合成完了後も膜透過可能な状態を維持することができる((1)-1-b の図参照)。この条件では、DHFR ドメインを含む 250 アミノ酸残基の N-ドメインは高効率で小胞体膜を透過し、内腔側で糖鎖付加を受けた。小胞体で、これほど大きなドメインが合成完了後に膜透過できる実験系は少ない。

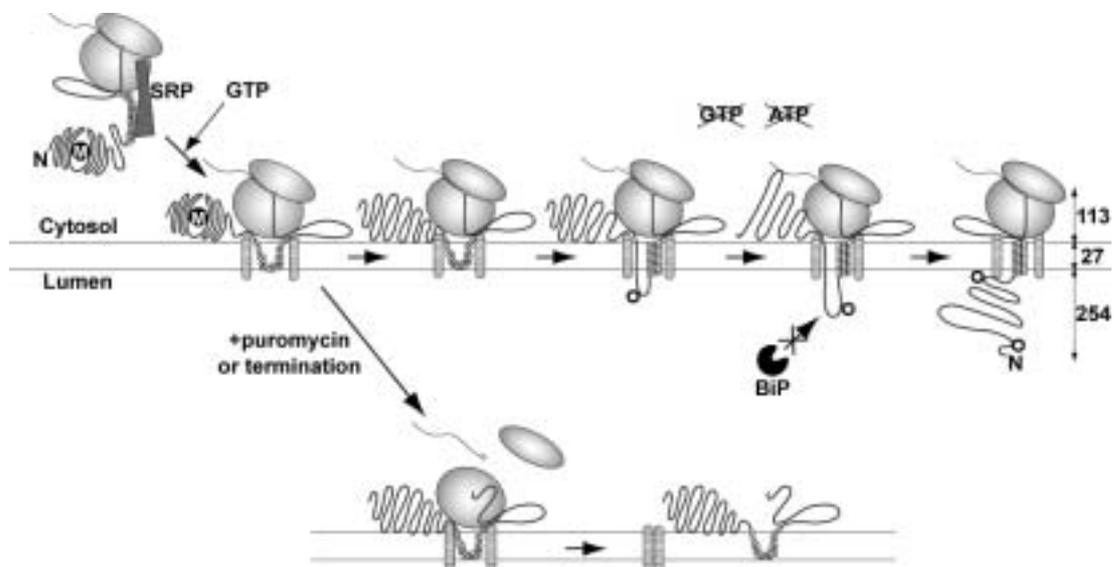
次に DHFR のリガンドであり DHFR 部分の立体構造を安定化するメトトレキセート(MTX)の影響を検討した。ミトコンドリアへのタンパク質インポート系と同様に、MTX の結合で立体構造が安定化した DHFR 部分は膜透過できなかつた。一方、構造形成が不全となっている変異型 DHFR では、MTX を加えても膜透過は抑制されなかつた。したがって、小胞体の膜透過系において、DHFR ドメインは合成途上にあるにもかかわらずリガンドが結合できる程度にまでフォールドしていること、安定にフォールドしたドメインは小胞体トランスロケータ孔を透過できないことが明らかになった。さらに、このように膜透過が抑制された状態でも、トランスロケータへの結合のステップまでは反応が進むことがわかつた。そこで、粗面小胞体を超遠心で沈殿させることにより反応系から MTX を除去したところ、膜透過が再開した。以上で、大きな N-ドメインの効率よい膜透過を自在に制御して観察する実験系を確立することができた。

##### (1)-1-b 大きなドメインの膜透過を駆動する要因(EMBO J., 2005)

上記の膜透過制御実験系を用いて、以下の知見を得た(図) N-ドメイン膜透過のエネルギーの要求性について検討したところ、RNC の小胞体膜への標的化は、GTP の非加水分解型アナログ(GMPPNP)で阻害されたが、同様の ATP アナログでは影響を受けなかつた。一方、標的化の後ではいずれのアナログも阻害効果を示さなかつた。SRP 及び SRP レセプターを介した小胞体標的化には GTP の加水分解が必須であるが、膜透過自体にはいずれの高エネルギー化合物も必要でないことがわかつた。粗面小胞体をアルカリ条件で処理することによって、BiP や PDI などの内腔成分をウエスタンブロッティングの検出限界以下まで除去しても、DHFR ドメインの膜透過には影響なかつた。N-ドメインの膜透過は、ATP や GTP のようなエネルギーを必要とせず、内腔タンパク質による引き込み機構にも依存しないと考えられる。N-ドメインの膜透過とシグナル配列の配置との関連を詳細に解析し

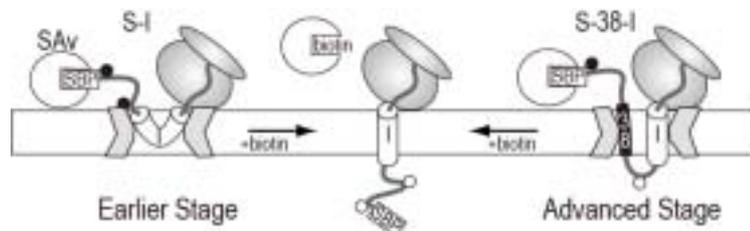
た。N-末端の DHFR ドメインを SA-I 配列から離してゆくと、膜透過効率は低下し、38 残基以上離すと膜透過はほとんど見られなくなった。このとき、シグナル配列は膜貫通トポロジーを形成できていた。この場合は、SA-I によって膜透過は開始されるものの、DHFR ドメインのアンフォールディングが達成できず、N-末端ドメインは透過しないと考えられた。したがって、シグナル配列の進入ストロークによる初発駆動力は十分に大きいですが、その後続く、定常的な膜透過の駆動力は DHFR ドメインをアンフォールドできるほどは大きくないことが分かる。一方、一度膜透過がスタートすれば 200 残基を超えるドメインでも、ATP などの高エネルギー化合物や内腔の BiP に依存せずに、ブラウン運動のみで膜透過すると考えられた。

興味深いことに、膜透過再開直前に、ポリペプチド鎖をリボソームから遊離させる作用をもつピユーロマイシンで処理すると、膜透過反応はほとんど進行しなかった。このことは、リボソームがトランスロケータの膜透過機能維持に積極的に寄与することを示すものである。リボソームが基質タンパク質標的化の後トランスロコンの機能構造維持にかかわっていることは極めて興味深い。



(1)-2 親和性タグによる中間状態解析系の構築 (J.Cell Biol., 2007)

本プロジェクトでは機能途上の小胞体トランスロケータ複合体の構造解明をめざし、まず基質タンパク質-トランスロケータ複合体の単離を検討した。親和性タグをもつ基質ポリペプチド鎖について膜透過中



間状態を作成し、トランスロケータとの複合体の単離を試みた。まず、上述のアミノ末端 DHFR ドメインの膜透過制御実験の成功を受けて、DHFR に変わる親和性タグを探索した。その結果ストレプトアビジン結合ペプチドタグ (Streptavidin Binding Peptide Tag; SBP-tag) が最も有用であることを見出した。すなわち、N-末端に融合した SBP-tag に Streptavidin (SAv) を結合させると、DHFR ドメインの場合と同様、N-ドメインの膜透過が抑制された (earlier-stage, 図)。この場合は、N-ドメインのどこもまだ膜透過していない。この中間体

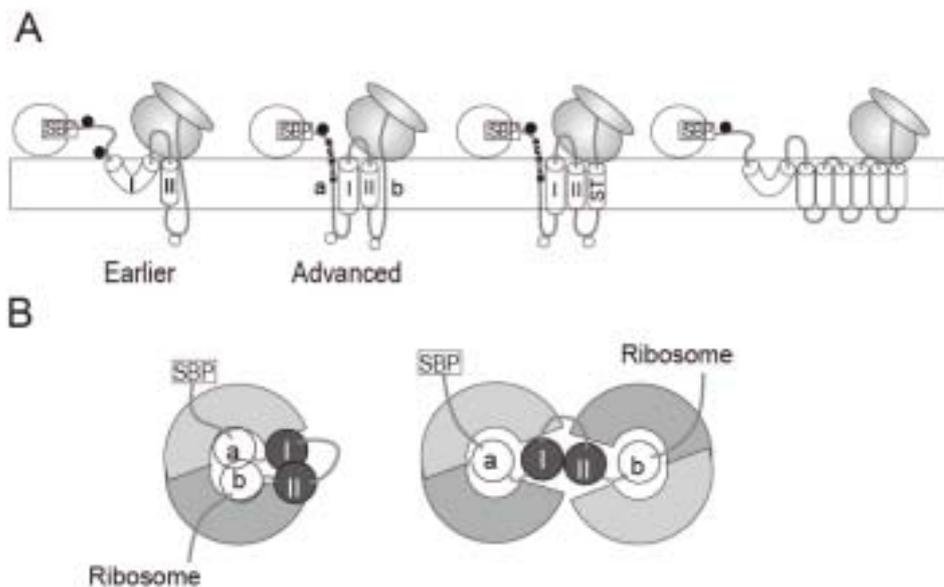
に、ビオチンを添加すると、N-末端の SBP-tag が SA<sub>v</sub> から解離し、N-ドメインの透過が再開することがわかった。この現象(チェイス反応)は、非常に効率よく 80%以上であった。

SA-I 配列と SBP-tag 間の距離を離すことによって、N-末端は膜透過していないが、その後ろは小胞体の内腔側に到達し、親水性セグメントとシグナル配列が膜貫通状態となっている興味深い中間状態を形成できた(advanced-stage)。earlier-stage ではシグナルアンカー配列の疎水性領域はシグナルポケットに配置されており、advanced-stage では N-末端ドメインのポリペプチド鎖がトランスロケータ孔を貫通していると考えられる。earlier-stage からの膜透過再開はリボソームに依存しているが、advanced-stage からの再開はリボソームを解離させるピューロマイシン処理によっても影響を受けなかった。SA<sub>v</sub> による膜透過抑制作用は、SBP の配列に依存し、膜透過抑制に必要な SBP-SA<sub>v</sub> 間の親和性は  $2 \times 10^8$  M の解離定数と釣り合うことがわかった。

以上の結果により、膜透過反応の駆動作用を定量的に取り扱うことが可能となり、次項に示すように複雑な膜タンパク質の組み込み中間体の解析を進めることができるようになった。また、磁気ビーズ付加した SA<sub>v</sub> を使えば、機能途上の前駆体-トランスロケータ複合体を効率よく単離できる可能性が出てきた。

### (1)-3 小胞体トランスロケータの柔軟性 (J.Cell Biol., 2007)

小胞体トランスロケータは、小胞体内腔を目的地とする親水性ドメインを膜面に垂直に透過させると同時に、進入してくる疎水性配列をチャンネル内に停止させて膜平面向かって横(ラテラル)方向に放出する。また、トランスロケータは複数回膜貫通型(マルチスパン型)の膜タンパク質の疎水性の低い膜貫通部分の形成をも可能にする。小胞体トランスロケータチャンネルの大きさについては、電子顕微鏡解析、蛍光消光実験、膜組み込み中間体のアルカリ抽出特性等から、20 ~ 60 Å、さらには 100 Å など、さまざまな数値が報告されてきた。SBP-tag による膜透過制御系を使って、



複数の膜貫通セグメントの膜組み込み過程とトランスロケータ孔のポリペプチド鎖許容特性を解析した(図)。SBP-タグを付加した N-末端ドメインに続いて複数の膜貫通配列を配置した、マルチスパン型モデル膜タンパク質を設計し、N 末端の膜透過の抑制が後半部分の膜透過や膜組み込みに影響するかどうか?後半に組み込まれた複数の膜貫通配列が、N-末端の膜透過中間体の透過に影響するかどうか?などの問題を系統的に調べた。その結果、予想外の知見が得られた。

複数の疎水性(膜貫通)セグメントを収容しても、トランスロケータチャンネルは透過可能状態を維持できた。C 端側に膜貫通配列を配置しても、N 末端セグメントは膜透過可能であった。さらに、GPCR 型 7 回膜貫通タンパク質であるロドプシンの膜貫通配列を 6 本配

置しても N 末端の膜透過状態は維持されていた。疎水性膜貫通セグメントがトランスロケータの孔に進入してきても、膜環境へと順次ラテラル移行させることにより、N 末端ドメインの膜透過に悪影響を及ぼさないことが考えられる。

トランスロケータのチャンネルは、同時に 2 本の親水性セグメントを収容可能である。第 2 の親水性セグメントをチャンネル内に配置しても、N 末端部分の膜透過は可能であった (図 A, advanced)。トランスロコンは膜貫通セグメントを、チャンネル内の親水的環境を維持しつつラテラル方向に膜内に放出し、さらに同時に第二の親水性セグメントを膜透過可能状態に維持できることが明らかになった。トランスロケータチャンネルのこれほど柔軟な挙動は、静的な結晶構造からは想像できないものである。

これらの結果に基づき、われわれは小胞体トランスロケータチャンネルを形成する Sec61 複合体が複数協調的に作用して機能するというモデル (図 B の右) を提唱している。このモデルは、これまであいまいであったトランスロケータの柔軟性と膜タンパク質の構造形成をうまく説明できるものである。

#### (1)-4 膜透過駆動力

DHFR ドメインの膜透過過程の解析で示唆された膜透過駆動力の変動をさらに明確にするために、膜透過を制御する SBP-tag および、力学的アンフォールディング特性の解析が進んでいる titin I27 ドメインの各種変異体の膜透過過程を解析した。N 末端に付加した I27 ドメイン各種変異体の膜透過効率の順番は、各ドメインの力学的不安定性の順番と完全に一致した。SA-I 配列と I27 ドメインの距離を徐々に離してゆくと、膜透過が最も容易であった I27(V13P)変異体でも膜透過効率が低下し、38 残基以上離すと膜透過が起こらなくなった。このとき、シグナル配列は膜貫通トポロジを形成していたので、膜透過反応が開始したものの、I27 ドメインの膜透過の段階で反応が停止したことが分かる。SBP-SAv 相互作用による N ドメインの膜透過抑制に必要な SAv 濃度を滴定により調べることで、膜透過駆動力の大きさを見積もることができた。SA-I 配列と SBP-タグが近接している earlier-stage に相当する場合と、両者が離れている advanced-stage に相当する場合とで膜透過抑制に要する SAv 濃度を測定すると、advanced-stage では earlier-stage の 10 分の 1 であった。したがって、SA-I から離れた部位における膜透過駆動力は、近い場所に比べて大きく低下することが確認された。シグナル配列 (SA-I) に Pro 残基を導入すると、I27 ドメインの膜透過効率が低下した。ただし I27 ドメインの抵抗がなければ、シグナル配列は SA-I 配列として正しい膜配向を示した。すなわち、Pro 導入により膜配向作用は変化しないが、膜透過駆動力が低下したものと考えられるこれは、シグナル配列の変異による「駆動力の低下」がはじめて示された例となった。SBP-tag を使った実験系でも、SA-I への Pro 導入による膜透過駆動力低下が同様に観察された。SA-I から大きく離れた advanced-stage に相当する段階での SBP-tag の膜透過は、シグナルへの Pro 導入によっても影響を受けなかった。SA-I から大きく離れた SBP-tag の膜透過は、Pro 導入によって影響を受けなくなった。

以上の実験結果は、シグナル配列が膜貫通ヘリックスを形成する時点で大きな膜透過駆動力を生み出すこと、しかしシグナル配列の膜貫通ヘリックス形成というストロークが完了してしまうと、駆動力が低下することを示す。SA-I の疎水セグメントが膜貫通トポロジを形成するときの安定化エネルギーが、N-ドメイン膜透過の駆動力を供給すると考えられる。これまで、シグナル配列は SRP による認識を受け、小胞体膜に標的化された後トランスロケータによる 2 段階目の識別を受けることがわかっていた。今回これらのシグナル認識の役割に加えて、シグナル配列は膜透過の駆動力そのものも供給するという新たな機能が明らかになったことになる。

#### (1)-5 トランスロケータによる正電荷識別のタイミング (J. Biol. Chem., 2006)

これまでに、ポリペプチド鎖の正電荷（塩基性残基）がトランスロケータチャンネルへの進入を抑制することをわれわれは見いだしている。この機能により、疎水性セグメントの膜透過停止が亢進し、シグナル配列の配向が決定される。本研究では、SA-I の配向決定における、正電荷と疎水性セグメントとの配置効果を詳細に解析し、以下の結果を得た。

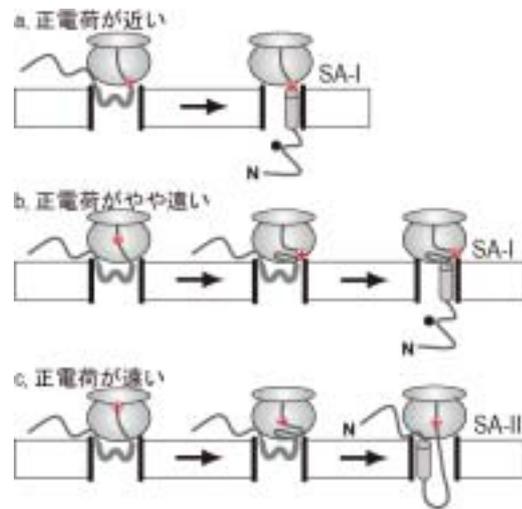
SA-I 配列の直後に存在する正電荷は、シグナル配列の配向を決定する作用を示す。SytII の SA-I に存在する正電荷を除去すると、正電荷の減少の程度に応じて配向が逆転する。

Lys でも Arg でも同様の効果を有する。

正電荷を SA-I の疎水性セグメントから C 末端側に離していくと、25 残基離れた場所からでも配向決定に寄与できる。正電荷は疎水性セグメントの直後に位置する必要はない（図）。

正電荷のこうした効果は、新生鎖がリボソームから外に出てトランスロケータに近接してから現れる。正電荷を C 末端側に移した場合には、N ドメインの膜透過のタイミングが遅れる（図）。

これらの実験結果は、小胞体トランスロケータは、基質タンパク質の一部ではなく、これまで考えられていたよりはるかに広い範囲のアミノ酸配列を認識していることを示す。そして、小胞体トランスロケータ内で疎水性配は、かなり長時間、再配向可能な中間状態にあるものと考えられた。



## (2) 研究成果の今後期待される効果

本研究では、小胞体トランスロケータにおけるポリペプチド鎖の動きを一時停止再開できる実験系を開発し、シグナル配列による駆動力供給、リボソームの積極的寄与、トランスロケータの予想外な柔軟性と広範囲な配列識別などを明らかにした。これらの成果は膜透過系の膜タンパク質の分子動力学計算、シミュレーション分野に新たな情報を提供するものである。また、新規機能性膜タンパク質のデザインに向けた基盤情報ともなる。

トランスロケータによる膜タンパク質の膜組み込みやフォールディング過程が明らかになるにつれ、膜タンパク質はトランスロケータの存在を前提として進化してきたと考えざるを得ない状況にある。物理化学的手法によるフォールディング研究分野でも、構造予測分野でもこのことが強く意識され始め、トランスロケータの関与を積極的に取り入れた、タンパク質フォールディング過程の研究が始まっている。これらの研究を踏まえて今後、機能性膜タンパク質の de novo デザインや、より高次な膜内配向を含めた機能性タンパク質複合体の設計に道が開けるものと期待される。

また、本プロジェクトで明らかにされた、オルガネラごとのトランスロケータの特性の大きな違いは、オルガネラ膜ごとで膜タンパク質の立体構造形成原理が異なる可能性を強く示唆する。研究の進展により、膜タンパク質の異なるフォールディングプロセス、原理の解明が進むものと期待される。さらには、オルガネラ膜の進化、膜タンパク質の進化と構造形成過程の進化という新しい研究視点に発展するものと期待される。

#### 4 研究参加者

##### 遠藤グループ (ミトコンドリアトランスロケータの作動原理の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
遠藤斗志也	名古屋大学	教授	研究統括	平成 14.11 ~ 20.3
吉久 徹	名古屋大学	准教授	遺伝学的・生化学的解析と指導	平成 14.11 ~ 20.3
西川周一	名古屋大学	准教授	細胞生物学的・生化学的解析と指導	平成 14.11 ~ 20.3
江崎雅俊	名古屋大学	学振 PD	チャネルの解析	平成 14.11 ~ 16.3
山本 林	名古屋大学	学振 PD, COE PD	新規因子探索, トランスロケータの連携	平成 15.4 ~ 18.3
佐藤健大	名古屋大学	大学院生	基質アンフォールディング	平成 14.11 ~ 18.11
江崎 芳	名古屋大学	科研費研究補助員	変異株作成, トランスロケータ精製	平成 14.11 ~ 16.3
横田美穂	名古屋大学	CREST 研究補助員	変異株, 変異体作成	平成 15.4 ~ 19.3
大嶋智恵	名古屋大学	CREST 研究補助員	変異株作成と解析	平成 16.1 ~ 19.3
直江真里	名古屋大学	大学院生	Tim40 の解析	平成 16.4 ~ 18.3
前田正洋	名古屋大学	CREST 研究員	構造生物学的解析	平成 16.4 ~ 17.4
田村 康	名古屋大学	大学院生	Tim23, Tim50 等の解析	平成 17.4 ~ 19.3
百瀬隆喜	名古屋大学	大学院生	構造生物学的解析	平成 18.4 ~ 20.3
山野晃史	名古屋大学	大学院生	基質アンフォールディング, トランスロケータ機能解析	平成 17.4 ~ 20.3
寺尾佳代子	名古屋大学	CREST 研究補助員	タンパク質調製, 結晶化	平成 19.4 ~ 20.3
田中沙千子	名古屋大学	CREST 研究補助員	変異株, 変異体作成	平成 19.4 ~ 20.3

##### 阪口グループ (小胞体トランスロケータの作動原理の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
阪口 雅郎	兵庫県立大	教授	企画, 指導	平成 14.11 ~ 20.3
木田 祐一郎	兵庫県立大	助手	小胞体実験の実行指導	平成 14.11 ~ 20.3
衣斐 義一	兵庫県立大	助教授	小胞体実験のサポート	平成 18.3 ~ 20.3
森本 富美子	兵庫県立大	大学院生	SBP-系の実験実行	平成 18.4 ~ 平成 19.3
山下 ゆかり	兵庫県立大	大学院生	小胞体実験の実行	平成 18.4 ~ 平成 19.3

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間

6 成果発表等  
遠藤グループ

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 19 件)

H. Yamamoto, M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo :  
Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner  
mitochondrial membranes  
Cell 111, 519-528 (2002)

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)

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)

S. Nishikawa, Y. Terazawa, T. Nakayama, A. Hirata, T. Makio 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. 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)

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)

K. Nakatsukasa, S. Okada, K. Umebayashi, R. Fukuda, S. Nishikawa, and T. Endo  
Roles of O-mannosylation of aberrant proteins in reduction of the load for endoplasmic reticulum  
chaperones in yeast  
J. Biol. Chem. 279, 49762-49772 (2004 )

M. Naoe, Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and T. Endo  
Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space  
J. Biol. Chem. 279, 47815-47821 (2004)

M. Esaki, H. Shimizu, T. Ono, H. Yamamoto, T. Kanamori, S. Nishikawa, and T. Endo  
Mitochondrial protein import: Requirement of the presequence elements and TOM components for  
precursor binding to the TOM complex

J. Biol. Chem. 279, 45701-45707 (2004)

D. Ishikawa, H. Yamamoto, Y. Tamura, K. Moritoh, and T. Endo  
Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate  $\beta$ -barrel protein assembly  
J. Cell Biol. 166, 621-627 (2004)

K. Yamano, D. Ishikawa, M. Esaki, and T. Endo  
Phosphate carrier has an ability to be sorted to either the TIM22 pathway or TIM23 pathway for its import into yeast mitochondria.  
J. Biol. Chem. 280, 10011-10017(2005)

H. Yamamoto, T. Momose, Y. Yatsukawa, C. Ohshima, D. Ishikawa, T. Sato, Y. Tamura, Y. Ohwa and T. Endo  
Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane.  
FEBS Lett. 579, 507-511 (2005)

A. Takano, T. Endo, and T. Yoshihisa  
tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast.  
Science 309, 140-142 (2005)

M. Igura, T. Ose, T. Obita, C. Sato, K. Maenaka, T. Endo, and D. Kohda  
Crystallization and preliminary X-ray analysis of mitochondrial presequence receptor Tom20 in complexes with a presequence from ALDH  
Acta Cryst Section F61, 514-517 (2005)

T. Sato, M. Esaki, J. M.Fernandez, and T. Endo  
Comparison of the protein unfolding pathways between mitochondrial protein import and atomic force microscopy measurements  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102, 17999-18004 (2005)

Y. Tamura, Y. Harada, K. Yamano, K. Watanabe, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and T. Endo  
Identification of Tam41 maintaining integrity of the TIM23 protein translocator complex in mitochondria  
J. Cell Biol. 174, 615-623(2006 )

T. Yoshihisa, C. Ohshima, K. Yunoki-Esaki, and T. Endo  
Cytoplasmic splicing of tRNA in *Saccharomyces cerevisiae*  
Genes Cells 12,285-297 (2007)

T. Momose, C.Ohshima, M.Maeda, T.Endo  
Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70.  
EMBO Rep. 8, 664-670 (2007)

T. Saitoh, M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, T. Endo, and D. Kohda  
Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states

EMBO J. 26, 4777-4787 (2007)

K. Yamano, Y. Yatsukawa, M. Esaki, A. E. A Hobbs, R. E. Jensen, and T. Endo  
Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import.  
J. Biol. Chem. 283: 3799-3807 (2008)

(2)その他の著作物 (総説、書籍など)

T. Endo and D. Kohda:

Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import (Review article).

Biochim. Biophys. Acta 1592, 3-14 (2002)

T. Endo

Mitochondrial protein flux

in Genome Science - Towards a New paradigm?

(eds. H. Yoshikawa, N. Ogasawara, and N. Satoh) pp27-32, Elsevier Science, Amsterdam (2002)

遠藤斗志也

特集：細胞内タンパク質の運命と翻訳から分解までを監視・制御する細胞内システム  
序にかえて：細胞内タンパク質の運命

実験医学 21, 866-868 (2003)

山本 林・江崎雅俊・遠藤斗志也

ミトコンドリアトランスロケータの連係プレー：タンパク質配送の迷宮 2つの膜で囲まれたミトコンドリアの問題

実験医学 21, 880-885 (2003)

遠藤斗志也, 江崎雅俊, 山本 林, 吉久 徹

ミトコンドリアをめぐるタンパク質フラックス

実験医学増刊「細胞内輸送研究の最前線」 21, 1889-1895 (2003)

西川周一, 中務邦雄, 遠藤斗志也

小胞体品質管理におけるシャペロンと糖鎖の役割：何が異常で何を除去すべきか  
蛋白質核酸酵素増刊「細胞における蛋白質の一生」49, 988-991 (2004)

遠藤斗志也, 吉久 徹

総論 蛋白質の移動(真核生物): 細胞内の交通管制システムがはたらく仕組み  
蛋白質核酸酵素増刊「細胞における蛋白質の一生」49, 877-888 (2004)

T. Endo

Protein transport to and within plant chloroplasts

Endocytobiosis Cell Res. 15, 294-299 (2004)

遠藤斗志也

ミトコンドリア内にタンパク質が取込まれる仕掛け

現代化学 2月号, 28-33 (2005)

西川周一，遠藤斗志也  
第 11 章(1) タンパク質の膜透過装置  
タンパク質科学：構造，物性，機能， 485-494  
後藤祐児，桑島邦博，谷澤克行，化学同人 (2005)

遠藤斗志也  
生体膜：脂質と二分子膜  
物質環境科学 I「分子から機能性物質・生体まで」，208-225  
田隅三生，浜田嘉昭，放送大学教育振興会 (2005)

遠藤斗志也  
生体膜：膜タンパク質と膜輸送  
物質環境科学 I「分子から機能性物質・生体まで」，226-239  
田隅三生，浜田嘉昭，放送大学教育振興会 (2005)

永田和宏，遠藤斗志也  
「タンパク質社会学」とは何か  
実験医学増刊 23「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏，遠藤斗志也編)，2213-2214 (2005)

遠藤斗志也，永田和宏  
概論：タンパク質の一生とタンパク質社会学  
実験医学増刊 23「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏，遠藤斗志也編)，2228-2233 (2005)

遠藤斗志也  
概説：タンパク質の配送・搬入とタンパク質が通る孔  
実験医学増刊 23「細胞内タンパク質の社会学」(永田和宏，遠藤斗志也編)，2272-2275 (2005)

遠藤斗志也，山本 林  
ミトコンドリアの外膜内膜の孔  
実験医学増刊 23 (永田和宏，遠藤斗志也編)，2297-2301 (2005)

西川周一，遠藤斗志也  
ミトコンドリアの膜透過装置  
細胞工学 24,786-790 (2005)

吉久 徹，高野 晃，遠藤斗志也  
核内 tRNA の生理的意義  
蛋白質核酸酵素増刊「細胞核の世界」51， 2232-2234(2006)

遠藤斗志也，吉久 徹，森 和俊，田口英樹  
研究の歴史：渾沌の前史から「タンパク質の一生」研究が開花するまで  
タンパク質の一生：集中マスター(遠藤斗志也，森和俊，田口英樹編)12-23，羊土社(2007)

遠藤斗志也，吉久 徹，森 和俊，田口英樹  
ブレイクスルーとなった実験法を中心に：そのとき「タンパク質の一生」研究の歴史が動いた  
タンパク質の一生：集中マスター(遠藤斗志也，森和俊，田口英樹編)25-35，羊土社 (2007)

遠藤斗志也

ブローベル・コード:交通管制という問題

タンパク質の一生:集中マスター(遠藤斗志也,森和俊,田口英樹編)58-66,羊土社(2007)

遠藤斗志也

トランスロコンはどうやって組立てられるのか

タンパク質の一生:集中マスター(遠藤斗志也,森和俊,田口英樹編)130,羊土社(2007)

遠藤斗志也

私のチャレンジしたい化学の未解決問題:オルガネラ構造を自在に操り自らの手で細胞をつくりたい

化学 62, 20-21 (2007)

吉久 徹, 遠藤斗志也

4.1 細胞の構造:概論

生物物理学ハンドブック(石渡信一,桂勲,桐野豊,美宅成樹編)193-197,朝倉書店(2007)

遠藤斗志也

ミトコンドリアを舞台とするタンパク質の交通

生物物理 48, 4-10 (2008)

西川周一, 遠藤斗志也

3.8 ミトコンドリア(第III章 真核生物としての細胞体制)

酵母のすべて:系統,細胞から分子まで(大隅良典,下田 親編)65-76,シュプリンガー・ジャパン(2007)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待講演 (国内会議 25件、国際会議 20件)

中務邦雄,梅林恭平,西川周一,遠藤斗志也

小胞体品質管理における糖鎖とシャペロンの役割

第75回日本生化学会大会シンポジウム「構造異常タンパク質の細胞内感知機構と細胞応答」

京都 2002.10.14-17

Toshiya Endo

Molecular mechanism of mitochondrial protein import

IMB Retreat Pre-meeting at IMB

台北 2002.12.5

江崎雅俊,金森 崇,西川周一,Inhae Shin, Peter G. Schuitz, 遠藤斗志也

タンパク質膜透過チャネルTom40のシャペロン機能

第25回分子生物学会年会ワークショップ「こんなところにもシャペロン機能」

横浜 2002.12.11-14

遠藤斗志也

タンパク質の一生を支援する細胞内システム

第5回生命化学研究会シンポジウム「熱い「化学」:生体分子から細胞へ」

宇治(京都) 2003.1.10

中務邦雄，梅林恭平，西川周一，遠藤斗志也  
小胞体品質管理におけるO結合型糖鎖付加の役割  
第56回細胞生物学会大会ワークショップ「タンパク質：生と死の生物学」  
大津 2003.5.14-16

Toshiya Endo Cooperation of translocators in mitochondrial protein import  
ELSO (European Life Science Organization) 2003, Sub-Group Meeting on translocation of proteins  
across membranes  
Dresden , Germany 2003.9.20-24

Toshiya Endo  
Coordinated functions of translocators in mitochondrial protein import.  
EURESCO Conference on Protein Targeting  
Spa, Belgium 2003.9.26-10.1

Toshiya Endo  
Functions of translocator in protein import into mitochondria  
Symposium on Biological Membranes, 10th FAOBMB Congress  
Bangalore, India 2003.12.7-11

遠藤斗志也，佐藤健大，畔柳美香，Julio Fernandez，西川周一，江崎雅俊  
ミトコンドリアタンパク質の膜透過とアンフォールディングを駆動するインポートモータ  
の作動機構  
第3回ミトコンドリア研究会/COE 特別講演  
九州大学，福岡 2003.12.18-20

遠藤斗志也，山本 林，江崎雅俊  
酵母ミトコンドリアのプロテインフラックス  
第6回植物オルガネラワークショップ  
東京大学，東京 2004.3.26

Toshiya Endo  
Cooperation of translocators in unfolding and import of mitochondrial proteins Workshop on 'In  
vivo folding, transport and quality control'  
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science  
Yokohama 2004.4.14-18

遠藤斗志也  
タンパク質の膜透過を駆動するトランスロケータの作動原理  
特定領域研究「水と生体分子」「タンパク質の一生」共同主催公開シンポジウム「蛋白質  
のフォールディングとミスフォールディング」  
東京 2004.9.11

山本 林，石川大悟，直江真里，大和幸昌，遠藤斗志也  
タンパク質のミトコンドリア膜透過に關与する新規トランスロケータ構成因子の同定と機  
能解析  
第27回分子生物学会年会ワークショップ「タンパク質機能化の細胞内インフラストラク  
チャー」  
神戸 2004.12.8-1

遠藤斗志也

タンパク質のミトコンドリア移行の分子機構  
第27回分子生物学会年会シンポジウム「タンパク質の局在化と品質管理」  
神戸 2004.12.8-1

遠藤斗志也  
タンパク質膜透過にかかわるトランスロケータの構造と機能  
第42回生物物理学会年会シンポジウム「膜蛋白質の機能制御と細胞内輸送」  
京都 2004.12.13-15

Toshiya Endo  
Functions of mitochondrial translocators as protein nano-machines  
International Symposium 'Protein Sorting'  
Freiburg 2005.3.6-8

Toshiya Endo  
Motor functions of mitochondrial protein translocators  
Gordon Research Conference on Protein Transport Across Cell Membranes  
New London, NH, USA 2005.6.12-17

Toshiya Endo  
Import and sorting of mitochondrial proteins International Symposium on Membrane Dynamics  
and Cell Regulation  
福岡 2005.6.29

遠藤斗志也  
ミトコンドリア形成の分子基盤  
第5回日本蛋白質科学会年会シンポジウム「タンパク質の一生：タンパク質の細胞内輸送と  
修飾」  
福岡 2005.6.30-7.2

Toshiya Endo  
Mitochondrial protein import driven by molecular chaperones  
13th International Congress on Genes, Gene Families, and Isozymes  
Shanghai, China 2005.9.17-21

Tohru Yoshhisa, Akira Takano, Toshiya Endo  
tRNAs shuttle between the nucleus and cytoplasm in their life.  
International Symposium on Ran and Cell Cycle\_国際シンポジウム「細胞核機能の分子スイッチ  
Ranと細胞周期」  
淡路，兵庫 2005.10.2-4

Toshiya Endo  
How to drive mitochondrial protein import and sorting  
International Symposium on Life of Proteins  
淡路，兵庫 2005.10.30-11.3

Tohru Yoshhisa, Akira Takano, Toshiya Endo  
tRNAs shuttle between the nucleus and cytoplasm.  
21th tRNA Workshop  
Bangalore, India 2005.12.1-7

高野 晃，遠藤斗志也，吉久 徹  
出芽酵母におけるtRNAの核内輸送

第28回分子生物学会年会ワークショップ「細胞核機能とRNAダイナミクス」  
福岡 2005.12.8-10

遠藤斗志也\_  
ミトコンドリアタンパク質膜透過システムのバイオエネジェティクス  
日本生体エネルギー研究会第31回討論会シンポジウム「膜システムが支える多彩な生体エネルギー反応」  
名古屋 2005.12.19-21

Toshiya Endo  
Life of proteins in the cell  
21st Century COE-RCMS International Conference - Chemistry for Life  
Nagoya 2006.1.26-27

遠藤斗志也  
タンパク質の交通を管制するトランスロケータシステム  
第6回蛋白質科学会年会ワークショップ「蛋白質社会学：蛋白質の一生をケアする細胞内システム」  
京都 2006.4.24-26

中戸川万智子，西川周一，遠藤斗志也  
酵母小胞体関連分解に関与するMnl1pの機能解析  
特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第4回夏期シンポジウム  
浜松，静岡 2006.8.8-9

Shuh-ichi Nishikawa, Daisuke Maruyama, Masaya Yamamoto, and Toshiya Endo  
Analyses of the Hsp70 system in the endoplasmic reticulum of Arabidopsis thaliana.  
The 53rd NIBB Conference; Dynamic Organelles in Plant  
Okazaki 2006.6.14-17

遠藤斗志也  
細胞内タンパク質の交通管制システム  
第3回バイオサイエンスの最先端（インビトロジェンシンポジウム）  
湘南国際村（神奈川県） 2006.8.31-9.1

Toshiya Endo  
Mitochondrial protein translocators as protein nano-machines  
EMBO Conference, Protein transport systems: protein targeting and translocation  
Gdansk, Poland 2006.9.30-10.5

西川周一，丸山大輔，山本雅也，川鍋光慶，遠藤斗志也  
植物細胞小胞体のHsp70システムの解析  
日本分子生物学会2006フォーラム・シンポジウム「細胞内のタンパク質社会と品質管理」  
名古屋 2006.12..6-8

Toshiya Endo  
Towards understanding mitochondrial protein traffic in yeast  
International Symposium 'Milestones in the Life of Proteins'  
京都 2007.3.15-16

Takao Mori, Chiharu Ogasawara, Markus Englert, Hildburg Beier, Toshifumi Inada, Toshiya Endo,  
Tohru Yoshihisa

A novel function of tRNA ligase Rlg1p in Hac1p translation on unfolded protein response  
第7回日本分子生物学会春季シンポジウム  
淡路, 2007.4.23-24

Toshiya Endo  
Complex pathways and machineries for mitochondrial protein import  
International Symposium Molecular Machines in Protein Folding and Translocation  
Munich 2007.5.23-25

遠藤斗志也  
ミトコンドリアへのタンパク質移行の経路と装置 (英語講演)  
第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 シンポジウム「細胞内輸送とオルガネラ」  
福岡 2007.5.28-30

Toshiya Endo  
Functional network of mitochondrial translocator complexes GRC  
Protein Transport Across Cell Membranes  
Il Ciosso  
2007.6.10-15

遠藤斗志也  
タンパク質から学ぶ細胞内構造の構築原理  
科学技術未来戦略ワークショップ 階層的自己組織化のバイオナノテク  
東京 2007.6.22-23

Toshiya Endo  
Pathways and machineries for mitochondrial protein import in yeast  
XXII International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology\_Symposium  
Compartmentation of Cellular Activities  
Melbourne 2007.7.1-6

Toshiya Endo  
How protein import motors function in mitochondrial protein import  
FASEB Summer Research Conference : Assembly of the Mitochondrial Respiratory Chain  
Tucson, Arizona, USA 2007.8.5-10

遠藤斗志也  
ミトコンドリアタンパク質の交通とその制御  
第19回高遠・分子細胞生物学シンポジウム: シグナルと細胞組織調節  
伊那(長野) 2007.8.23-24

遠藤斗志也  
ミトコンドリアタンパク質の交通と膜透過装置  
第19回日本生化学会近畿支部シンポジウム「ミトコンドリアとレドックス科学の新展開」  
大阪 2007.9.15

遠藤斗志也  
ミトコンドリアタンパク質輸送システムの品質管理  
BMB2007 ワークショップ「タンパク質の品質管理とオルガネラダイナミクス」  
横浜 2007.12.11-15

遠藤斗志也

ミトコンドリア膜を舞台とするタンパク質の交通

大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の膜透過と膜挿入の分子メカニズム - その核心に迫る」

大阪 2008.1.24-25

遠藤斗志也

タンパク質の一生とタンパク質社会：ミトコンドリアタンパク質の交通と小胞体におけるタンパク質品質管理

島根大学医学部医学部長セミナー

出雲 2008.2.22

口頭発表

(国内会議 8件、国際会議 1件)

高野 晃、江本 大地、遠藤 斗志也、吉久 徹

出芽酵母におけるtRNAの細胞内動態の解析

第6回RNAミーティング

熊本 2004.8.4-8.6

Tohru Yoshihisa, Akira Takano, Kaori Esaki-Yunoki, Takao Mori, Chiharu Ogasawara, Toshiya Endo

Cytoplasmic splicing of tRNA in *S. cerevisiae*

Cold Spring Harbor Meeting: Dynamic Organization of Nuclear Functions

Cold Spring Harbor, USA 2004.9.29-10.3

高野晃，遠藤斗志也，吉久徹

tRNAは核と細胞質の間をシャトルする

第7回RNAミーティング

弘前、2005.8.9-11

山野晃史，遠藤斗志也

PAM16の輸送におけるミトコンドリア内仕分け機構の解析

第78回日本生化学会大会

神戸 2005.10.19-22

森隆雄、小笠原千春、Markus Englert、Hildburg Beier、遠藤斗志也、吉久徹

UPRにおける酵母 tRNA リガーゼ Rlg1p の翻訳制御機能

日本 RNA 学会年会

淡路 2006.7.18-20

田村康，原田佳宗，山野晃史，渡辺一章，石川大悟，大嶋智恵，西川周一，山本林，遠藤斗志也

TIM23複合体の機能的形状を維持する新規因子Tam41の解析

日本分子生物学会2006フォーラム

名古屋 2006.12..6-8

丸山大輔，遠藤斗志也，西川周一

シロイヌナズナの胞体Hsp70変異体がもたらす生殖異

第48回日本植物生理学会年会  
松山 2007.3.28-30

山本雅也, 丸山大輔, 遠藤斗志也, 西川周一  
シロイヌナズナの生育における小胞体Jタンパク質の役割の解析  
第48回日本植物生理学会年会  
松山 2007.3.28-30

高野晃, 遠藤斗志也, 吉久徹  
出芽酵母におけるtRNA核内輸送因子の検索  
第9回RNAミーティング  
名古屋 2007.7.28-31

ポスター発表 (国内会議 77件、国際会議 26件)  
槇尾 匡, 西川周一, 紅 朋浩, 遠藤斗志也  
出芽酵母の核膜融合における BiP/Jem1p システムの役割  
第25回分子生物学会年会  
横浜 2002.12.11-14

T. Yoshihisa, K. Yunoki-Esaki, C. Ohshima, N. Tanaka, C. Ogasawara, A. Takano, and T. Endo  
Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria  
42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting  
San Francisco, USA 2002.12.14-18

Hayashi Yamamoto, Masatoshi Esaki, Takashi Kanamori, Yasushi Tamura, Shuh-ichi Nishikawa, Toshiya Endo  
Tim50, a new subunit of the TIM23 complex that links mitochondrial protein translocation across the outer membrane and that across the inner membrane 42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting  
San Francisco, USA 2002.12.14-18

Kunio Nakatsukasa, Kyohei Umebayashi, Shuh-ichi Nishikawa, and Toshiya Endo  
Role of O-mannosylation in Protein Quality Control in the ER  
42nd American Society for Cell Biology Annual Meeting  
San Francisco, USA 2002.12.14-18

槇尾 匡, 中山 剛, 西川周一, 遠藤斗志也  
出芽酵母 Nep98p のホモオリゴマー形成と SPB への局在化  
第56回細胞生物学会大会  
大津 2003.5.14-16

Tadashi Makio, Shuh-ichi Nishikawa, Yumiko Terazawa, Takeshi Nakayama, Aiko Hirata and Toshiya Endo  
Analysis of the function of Nep98p, a new component of the yeast spindle pole body that is essential for nuclear division and fusion  
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting in Yeast Cell Biology  
Cold Spring Harbor, New York 2003.8.12-17

Kunio Nakatsukasa, Kyohei Umebayashi, Shuh-ichi Nishikawa, Toshiya Endo  
O-mannosylation is a novel mechanism to deal with aberrant proteins in quality control in the

endoplasmic reticulum.  
第 76 回日本生化学会大会  
横浜 2003.10.15-18

Hayashi Yamamoto, Shingo Kitamura, Kayoko Terao, Mayumi Uchida, Masatoshi Esaki, Shuh-ichi Nishikawa, Tohru Yoshihisa, Toshiya Endo  
Proteome-wide approach for identification of substrates for mitochondrial protein import receptor Tom70  
第 76 回日本生化学会大会  
横浜 2003.10.15-18

Yasushi Tamura, Hayashi Yamamoto, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo  
Poles of Tim23-Tim50 interactions in mitochondrial protein import  
第 76 回日本生化学会大会  
横浜 2003.10.15-18

Mika Kuroyanagi, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo  
Characterization of the Hsp70 protein import motor in mitochondria  
第 76 回日本生化学会大会  
横浜 2003.10.15-18

Takashi Momose, Nobuka Ito, Daisuke Kohda, Toshiya Endo  
NMR analysis of the recognition of internal mitochondrial targeting signals by Tom70  
第 76 回日本生化学会大会  
横浜 2003.10.15-18

Tohru Yoshihisa, Akira Takano, Daichi Emoto, Kaori Yunoki-Esaki, Chie Ohshima, Chiharu Ogasawara, Nobuyuki Tanaka and Toshiya Endo  
tRNA splicing in the cytoplasm; unexpected intracellular dynamics of tRNAs in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.  
RNA2003  
Kyoto 2003.11.24-27

大和幸昌, 直江真里, 山本 林, 遠藤斗志也  
タンパク質のミトコンドリア膜透過に關与する新規トランスロケータ構成因子の検索  
第 26 回分子生物学会年会  
神戸 2003.12.10-13

高野 晃, 江本大地, 遠藤斗志也, 吉久 徹  
出芽酵母における成熟体 tRNA の細胞内動態の解析: 成熟体 tRNA の核内輸送  
第 26 回分子生物学会年会  
神戸 2003.12.10-13

井倉真由美, 帯田孝之, 遠藤斗志也, 前仲勝実, 神田大輔  
ラット Tom20 タンパク質と ALDH プレ配列複合体の結晶化  
日本結晶学会  
熊本 2003.12

西川周一, 丸山大輔, 遠藤斗志也  
シロイヌナズナ小胞体のDnaJホモログ遺伝子の解析  
第45回日本植物生理学会年会  
東京都立大学教養部キャンパス 2004.3.27-29

Takehiro Satoh, Masatoshi Esaki, Julio M. Fernandez, and Toshiya Endo  
Relationship between local/global structures and import rates of mitochondrial precursor proteins  
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science  
Yokohama 2004.4.14-18

Takayuki Obita, Mayumi Igura, Toshiya Endo, Katsumi Maenaka, and Daisuke Kohda  
Structural basis of the decoding of the mitochondrial targeting signals by Tom20  
The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science  
Yokohama 2004.4.14-18

Shuh-ichi Nishikawa, Kunio Nakatsukasa, Kyohei Umebayashi, Ryoichi Fukuda and Toshiya Endo  
*O*-mannosylation prevents aggregation of aberrant proteins independently of endoplasmic reticulum chaperones  
CSHL Meeting on Molecular Chaperones & The Heat Shock Response  
Cold Spring Harbor Laboratory 2004.5-9

西川周一, 榎尾匡, 中務邦雄, 岡田茂男, 橋本邦男, 遠藤斗志也  
O-結合型糖鎖付加による異常タンパク質の小胞体品質管理  
特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第2回夏期シンポジウム  
木更津市 2004.8.26-27

Yasushi Tamura, Hayashi Yamamoto, and Toshiya Endo  
Characterization of Tim23 variants that have mutations in their intermembrane space domains.  
International Meeting on the Topogenesis of Organellar Proteins  
Bochum, Germany 2004.10.28-30

Hayashi Yamamoto, Daigo Ishikawa, Yasushi Tamura, Kaori Moritoh, and Toshiya Endo  
Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate  $\beta$ -barrel protein assembly  
International Meeting on the Topogenesis of Organellar Proteins  
Bochum, Germany 2004.10.28-30

山野晃史, 江崎雅俊, 遠藤斗志也  
TIM22 複合体と TIM23 複合体の輸送経路の仕分けの仕組みの解析  
第77回日本生化学会大会  
横浜 2004.10.13-16

浅野悠史, 矢口 博, 吉久 徹, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア外膜タンパク質のラテラルな解放挿入に欠損のある tom40 変異体の単離と解析  
第77回日本生化学会大会  
横浜 2004.10.13-16

八津川洋一, 伊藤順香, 江崎雅俊, 遠藤斗志也  
ミトコンドリアのターゲティングシグナル認識における Tom20 と Tom22 の役割  
第77回日本生化学会大会  
横浜 2004.10.13-16

石川大悟, 山本 林, 田村 康, 森藤かおり, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア外膜における  $\beta$ -barrel タンパク質の assembly に関わる新規因子の同定と機能解析  
第77回日本生化学会大会

横浜 2004.10.13-16

Daigo Ishikawa, Hayashi Yamamoto, Yasushi Tamura, Kaori Moritoh, Toshiya Endo  
Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate  $\beta$ -barrel protein assembly

第 27 回分子生物学会年会

神戸 2004.12.8-11

田村 康, 山本 林, 遠藤斗志也

Characterization of Tim23 variants that have mutations in their intermembrane space domains

第 27 回分子生物学会年会

神戸 2004.12.8-11

直江真里, 大和幸昌, 石川大悟, 大嶋智恵, 西川周一, 山本 林, 遠藤斗志也

新規ミトコンドリアタンパク質 Tim40 は Small Tim のアセンブリーに關与する

第 27 回分子生物学会年会

神戸 2004.12.8-11

槇尾 匡, 西川周一, 遠藤斗志也

Nep98p 温度感受性変異体 Nep98-7p の分解

第 27 回分子生物学会年会

神戸 2004.12.8-11

森 隆雄, 小笠原千春, 遠藤斗志也, 吉久 徹

tRNA スプライシングに關わる酵母 tRNA リガーゼ Rlg1p の解析

第 27 回分子生物学会年会

神戸 2004.12.8-11

井倉真由美, 帯田孝之, 尾瀬農之, 遠藤斗志也, 前仲勝実, 神田大輔

ラット Tom20 タンパク質と ALDH プレ配列複合体の X 線結晶構造解析

第 27 回分子生物学会年会

神戸 2004.12.8-11

佐藤健大, 江崎雅俊, Julio M. Fernandez, 遠藤斗志也

ミトコンドリア蛋白質の膜透過反応における局所・全体構造安定性と膜透過速度の關連性の解析

第 42 回生物物理学会年会

京都 2004.12.13-15

丸山大輔, 西川周一, 山本雅也, 小池仁, 遠藤斗志也

シロイヌナズナ小胞体の Hsp70 システムの機能解析

第 46 回日本植物生理学会年会

新潟 2005.3.24-26

百瀬隆喜, 前田正洋, 山本 林, 遠藤斗志也

ミトコンドリア膜透過装置構成因子 Tim15 の NMR 解析

第 69 回日本生化学会中部支部例会

名古屋 2005.5.21

高野 晃, 遠藤斗志也, 吉久 徹

出芽酵母における成熟体 tRNA の細胞内動態

第 69 回日本生化学会中部支部例会  
名古屋 2005.5.21

Akira Takano, Toshiya Endo, and Tohru Yoshihisa  
tRNA actively shuttles between the nucleus and the cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*  
第 58 回細胞生物学会大会  
大宮 2005.6.15-17

Mari Naoe, Yukimasa Ohwa, Daigo Ishikawa, Chie Ohshima, Shuh-ichi Nishikawa, Hayashi Yamamoto, and Toshiya Endo  
Identification of Tim40 that mediates protein sorting to mitochondrial intermembrane space  
第 58 回細胞生物学会大会  
大宮 2005.6.15-17

井倉真由実, 帯田孝之, 尾瀬農之, 遠藤斗志也, 前仲勝実, 神田大輔  
ラット Tom20 タンパク質と ALDH プレ配列複合体の X 線結晶構造解析  
第 5 回日本蛋白質科学会年会  
福岡 2005.6.30-7.2

百瀬隆喜, 前田正洋, 山本 林, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア膜透過装置構成因子 Tim15 の NMR 解析  
第 5 回日本蛋白質科学会年会  
福岡 2005.6.30-7.2

山野晃史, 石川大悟, 江崎雅俊, 遠藤斗志也  
TIM22 複合体と TIM23 複合体の仕分けの仕組みの解析  
第 5 回日本蛋白質科学会年会  
福岡 2005.6.30-7.2

田村 康, 山本 林, 遠藤斗志也  
膜間部に変異を有する Tim23 変異株の解析  
第 5 回日本蛋白質科学会年会  
福岡 2005.6.30-7.2

佐藤健大, 江崎雅俊, Julio Fernandez, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア蛋白質の構造安定性と膜透過速度の関連性の解析  
第 5 回日本蛋白質科学会年会  
福岡 2005.6.30-7.2

百瀬隆喜, 前田正洋, 山本林, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア膜透過装置構成因子 TIM15 の機能解析  
第 78 回日本生化学会大会  
神戸 2005.10.19-22

丸山美幸, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア外膜における TOM40 のアセンブリー機構の解析  
第 78 回日本生化学会大会  
神戸 2005.10.19-22

原田佳宗, 石川大悟, 山本林, 遠藤斗志也  
TIM23 複合体経路のタンパク質膜透過に関する新規因子 p40 の機能解析

第 78 回日本生化学会大会  
神戸 2005.10.19-22

Koji Yamano, Mika Kuroyanagi, Mihoko Yokota, Masatoshi Esaki, and Toshiya Endo  
Measurement of the step-size of Hsp70 protein import motor in mitochondria  
International Symposium on Life of Proteins  
淡路, 兵庫 2005.10.30-11.3

Takaki Momose, Masahiro Maeda, Hayashi Yamamoto and Toshiya Endo  
NMR and functional analysis of the mitochondrial translocator protein Tim15  
International Symposium on Life of Proteins I  
淡路, 兵庫 2005.10.30-11.3

森藤かおり, 三浦麻美, 山本 林, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア外膜  $\beta$ -パレルタンパク質 Tom40 のアセンブリー経路の部位特異的光架橋による解析  
第 28 回分子生物学会年会  
福岡 2005.12.8-10

佐藤喜哉, 田中信行, 遠藤斗志也, 吉久 徹  
出芽酵母 tRNA splicing endonuclease サブユニット Sen54p の機能解析  
第 28 回分子生物学会年会  
福岡 2005.12.8-10

井倉真由実, 帯田孝之, 尾瀬農之, 遠藤斗志也, 前仲勝実, 神田大輔  
ミトコンドリアプレ配列認識のための Tom20 タンパク質の動的構造  
第 28 回分子生物学会年会  
福岡 2005.12.8-10

山本 林, 伊藤順香, 八津川洋一, 江崎雅俊, 小代俊浩, 神田大輔, 遠藤斗志也  
タンパク質のミトコンドリア膜透過における受容体タンパク質 Tom20 の 2 つの役割  
第 28 回分子生物学会年会  
福岡 2005.12.8-10

五十棲規嘉, 前田正洋, 山本 林, 百瀬隆喜, 伊藤順香, 遠藤斗志也  
NMR によるミトコンドリア内膜タンパク質 Tim50 の受容体-プレ配列相互作用の解析  
第 28 回分子生物学会年会  
福岡 2005.12.8-10

山本雅也, 丸山大輔, 遠藤斗志也, 西川周一  
シロイヌナズナにおける小胞体 J ドメインタンパク質の解析  
第 28 回分子生物学会年会  
福岡 2005.12.8-10

山野晃史, 畔柳美香, 横田三穂子, 江崎雅俊, 遠藤斗志也  
ミトコンドリアタンパク質のインポートモータ mtHsp70 のステップサイズの測定  
第 28 回分子生物学会年会  
福岡 2005.12.8-10

Yasushi Tamura, Hayashi Yamamoto, Toshiya Endo  
The role of Tim23-Tim50 interaction in mitochondrial translocation.

The 45th Annual Meeting of ASCB  
San Francisco, USA 2005.12.10-14

Takehiro Sato, Masatoshi Esaki, Julio M. Fernandez, Toshiya Endo  
Comparison of the protein unfolding pathways between mitochondrial import and atomic force  
microscopy measurements  
The 45th Annual Meeting of ASCB  
San Francisco, USA 2005.12.10-14

Junko Hosoya, Takehiro Sato, Koreaki Ito, and Toshiya Endo  
Use of SecM to monitor the physical pulling force by mitochondrial Hsp70 in protein import into  
mitochondria  
International Conference on Mitochondria and Life 2005  
Tokyo 2005.12.14-17

Keiko Morishita, Takehiro Sato, Koreaki Ito, and Toshiya Endo  
Structural analysis of mitochondrial inner membrane protein Tim21  
International Conference on Mitochondria and Life 2005  
Tokyo 2005.12.14-17

Takaki Momose, Masahiro Maeda, Hayashi Yamamoto, and Toshiya Endo  
NMR and functional analyses of Tim15, a member of yeast mitochondrial translocator proteins  
21st Century COE-RCMS International Conference - Chemistry for Life  
Nagoya 2006.1.26-27

Akira Takano, Toshiya Endo, and Tohry Yoshihisa  
tRNA actively shuttles between the nucleus and the cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*.  
21st Century COE-RCMS International Conference - Chemistry for Life  
Nagoya 2006.1.26-27

Yasushi Tamura, Hayashi Yamamoto, and Toshiya Endo  
Roles of Tim23-Tim50 interactions in mitochondrial protein import  
21st Century COE-RCMS International Conference - Chemistry for Life  
Nagoya 2006.1.26-27

Mari Naoe, Yukimasa Ohwa, Daigo Ishikawa, Chie Ohshima, Shuh-ichi Nishikawa, Hayashi  
Yamamoto and Toshiya Endo  
Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space  
21st Century COE-RCMS International Conference - Chemistry for Life  
Nagoya 2006.1.26-27

Takehiro Sato, Masatoshi Esaki, Julio M. Fernandez, and Toshiya Endo  
Comparison of the protein unfolding pathways between mitochondrial import and atomic force  
microscopy measurements  
21st Century COE-RCMS International Conference - Chemistry for Life  
Nagoya 2006.1.26-27

丸山大輔, 川鍋光慶, 小池仁, 遠藤斗志也, 西川周一  
シロイヌナズナにおける BiP の機能解析  
第 47 回植物生理学会年会  
つくば 2006.3.19-21

田村康, 原田佳宗, 西川周一, 遠藤斗志也  
新規ミトコンドリア膜透過装置構成因子 Tim41 の機能解析

第6回蛋白質科学会年会

京都 2006.4.24-26

高橋央, 北村真吾, 山本林, 田村康, 西川周一, 吉久徹, 遠藤斗志也

新規ミトコンドリアのインポート受容体 Tom70 が認識するミトコンドリア移行シグナルの解析

第6回蛋白質科学会年会

京都 2006.4.24-26

山野晃史, 畔柳美香, 横田美穂子, 江崎雅俊, 遠藤斗志也

ミトコンドリアタンパク質のインポートモーター mtHsp70 のステップサイズの測定

第70回生化学会中部支部会例会・シンポジウム

名古屋 2006.5.20

小黒隆臣, 前田正洋, 佐藤健大, 百瀬隆喜, 遠藤斗志也

titin I27 変異体の NMR 解析

第70回生化学会中部支部会例会・シンポジウム

名古屋 2006.5.20

田村康, 原田佳宗, 渡辺一章, 石川大悟, 大嶋智恵, 西川周一, 山本林, 遠藤斗志也

新規ミトコンドリア膜透過装置構成因子 Tim41 の機能解析

第70回生化学会中部支部会例会・シンポジウム

名古屋 2006.5.20

中戸川万智子, 西川周一, 遠藤斗志也

酵母小胞体関連分解に関与する Mnl1p の機能解析

第70回生化学会中部支部会例会・シンポジウム

名古屋 2006.5.20

Daisuke Maruyama, Shuh-ichi Nishikawa, Masaya Yamamoto and Toshiya Endo

Analyses of the Hsp70 System in the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis thaliana*

The 53rd NIBB conference: Dynamic Organelles in Plants

岡崎 2006.6.14-17

森俊輔, 藤城雅子, 花村雅人, 遠藤斗志也, 吉久徹

tRNA のイントロンは出芽酵母に必須か

日本 RNA 学会年会

淡路 2006.7.18-20

Takao Mori, Chiharu Ogasawara, Markus Englert, Hildburg Beier, Toshiya Endo, and Yoshihisa Tohru

tRNA ligase has dual functions on unfolded protein response through Hac1p expression

CHSL Meeting on Dynamic Organization of Nuclear Function

Cold Spring Harbor, 2006.9.27-10.1

Yasushi Tamura, Yoshihiro Harada, Koji Yamano, Kazuaki Watanaabe, Daisuke Ishikawa, Chie Ohshima, Shuh-ichi Nishikawa, Hayashi Yamamoto, and Toshiya Endo

Identification of Tam41 maintaining integrity of the TIM23 protein translocator complex in mitochondria

EMBO Conference, Protein transport systems: protein targeting and translocation

Gdansk, Poland 2006.9.30-10.5

Koji Yamano, Mika Kuroyanagi, Mihoko Yokota, and Toshiya Endo  
Measurement of the step-size of Hsp70 protein import motor in mitochondria  
EMBO Conference, Protein transport systems: protein targeting and translocation  
Gdansk, Poland 2006.9.30-10.5

三浦麻美, 森藤かおり, 山本林, 山野晃史, 遠藤斗志也  
部位特異的光架橋によるミトコンドリア外膜 バレルタンパク質 Tom40 のアセンブリー過程の解析  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12.6-8

櫻井勇希, 寺尾佳代子, 佐藤健大, 遠藤斗志也  
Sam50 によるミトコンドリア バレル型膜タンパク質認識機構の解析  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12..6-8

渡辺一章, 間渕英, 山本林, 田村康, 山野晃史, P.G. Schultz, 遠藤斗志也  
酵母内 BPA 部位特異的光架橋によるミトコンドリア内膜膜透過装置 TIM23 複合体の解析  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12..6-8

山野晃史, 八津川洋一, 江崎雅俊, Robert E. Jensen, 遠藤斗志也  
ミトコンドリア局在化シグナルの受容体 Tom20 と Tom22 の役割  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12..6-8

中戸川万智子, 西川周一, 遠藤斗志也  
小胞体関連分解に關与する Mnl1p の局在と相互作用因子に關する解析  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12..6-8

川鍋光慶, 丸山大輔, 遠藤斗志也, 西川周一  
植物細胞における新規小胞体関連分解基質の開発  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12..6-8

山本雅也, 丸山大輔, 遠藤斗志也, 西川周一  
シロイヌナズナにおける小胞体 J タンパク質の機能解析  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12..6-8

丸山大輔, 遠藤斗志也, 西川周一  
シロイヌナズナ小胞体 Hsp70 の機能欠損変異体の解析  
日本分子生物学会 2006 フォーラム  
名古屋 2006.12..6-8

百瀬隆喜, 前田正洋, 遠藤斗志也  
ミトコンドリアトランスロケータ Tim15 の立体構造解析  
日本分子生物学会 2006 フォーラム

名古屋 2006.12..6-8

小黑隆臣, 前田正洋, 佐藤健大, 百瀬隆喜, 遠藤斗志也

titn I27 変異体の NMR 解析

日本分子生物学会 2006 フォーラム

名古屋 2006.12..6-8

花村雅人, 森隆雄, 遠藤斗志也, 吉久徹

酵母細胞における tRNA ligase の機能領域の検討 ~ 標的 RNA の 3'末端を検出する新手法による解析 ~

日本分子生物学会 2006 フォーラム

名古屋 2006.12..6-8

高野晃, 花村雅人, 遠藤斗志也, 吉久徹

出芽酵母における tRNA 核内輸送因子の検索

日本分子生物学会 2006 フォーラム

名古屋 2006.12..6-8

森俊輔, 藤城雅子, 花村雅人, 遠藤斗志也, 吉久徹

tRNA のイントロンは出芽酵母に必須か

日本分子生物学会 2006 フォーラム

名古屋 2006.12..6-8

間淵英, 渡辺一章, 山野晃史, 田村康, 山本林, 西川周一, 吉久徹, Peter G. Schultz, 遠藤斗志也

出芽酵母内部位特異的光架橋による TOM40 複合体のサブユニット間相互作用の解析

日本分子生物学会 2006 フォーラム

名古屋 2006.12..6-8

山本雅也, 丸山大輔, 遠藤斗志也, 西川周一

シロイヌナズナ小胞体 J タンパク質の解析

第 71 回日本生化学会中部支部例会

名古屋 2007.5.19

中戸川万智子, 西川周一, 遠藤斗志也

小胞体関連分解に関与する Mnl1p の局在と相互作用因子の解析

第 71 回日本生化学会中部支部例会

名古屋 2007.5.19

高野晃, 遠藤斗志也, 吉久徹

出芽酵母における tRNA 核内輸送因子の検索

第 71 回日本生化学会中部支部例会

名古屋 2007.5.19

山野晃史, 八津川洋一, 江崎雅俊, Robert E. Jensen, 遠藤斗志也

ミトコンドリア局在化シグナルの受容体 Tom20 と Tom22 の役割

第 71 回日本生化学会中部支部例会

名古屋 2007.5.19

百瀬隆喜, 大島智恵, 前田正博, 遠藤斗志也

Tim15 と mtHSP70 間の相互作用の構造学的基盤  
第 71 回日本生化学会中部支部例会  
名古屋 2007.5.19

森俊輔、藤城雅子、花村雅人、遠藤斗志也、吉久徹  
tRNA のイントロンは出芽酵母に必要なか  
第 9 回 RNA ミーティング  
名古屋 2007.7.28-31

横山多可志, 森下佳子, 前田正洋, 百瀬隆喜, 遠藤斗志也  
タンパク質輸送と酸化リン酸化の接点: NMR を用いた Tim21-Qcr6 間の相互作用解析  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

丸山大輔, 遠藤斗志也, 西川周一  
シロイヌナズナ小胞体 Hsp70 の機能解析  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

山本雅也, 遠藤斗志也, 西川周一  
植物の生育における小胞体品質管理機構の役割 - 小胞体 J タンパク質に注目した解析  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

永井宏征, 西川周一, 遠藤斗志也  
小胞体関連分解におけるタンパク質の高次構造と糖鎖の役割: 改変した ERAD 基質を利用した解析  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

中戸川万智子, 西川周一, 遠藤斗志也  
Mn11-PDI 複合体の酵母小胞体関連分解における役割  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

塩田拓也, 間渕英, 山野晃史, Peter G. Schultz, 遠藤斗志也  
In vivo 部位特異的光架橋法による外膜透過装置構成因子 Tom22 のサブユニット間相互作用の解析  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

三浦麻美, 丸山美幸, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也  
キメラタンパク質を用いたミトコンドリア外膜 バレルタンパク質 Tom40 のアセンブリー経路の解析  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

山野晃史, 三浦麻美, 遠藤斗志也  
出芽酵母におけるミトコンドリア外膜 バレル膜タンパク質のアセンブリー過程の解析  
BMB2007  
横浜 2007.12.11-15

塩田拓也, 間渕英, 山野晃史, Peter G. Schultz, 遠藤斗志也

In vivo 部位特異的光架橋法による外膜膜透過装置構成因子 Tom22 のサブユニット間相互作用の解析 (ポスター)

大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の膜透過と膜挿入の分子メカニズム - その核心に迫る」

大阪 2008.1.24-25

Takaki Momose, Chie Ohshima, Masahiro Maeda, and Toshiya Endo

Structural basis of the molecular recognition of mtHSP70 by Tim15, a cochaperone for mtHSP70

特定領域「膜インタフェイス」国際シンポジウム in 福岡

福岡 2008.1.25-26

#### (4) 特許出願

国内出願 (0 件)

海外出願 (0 件)

#### (5) 受賞等

受賞

なし

#### 新聞報道

2002 年 11 月 15 日 中日新聞, 日経産業新聞

「新タンパク質 Tim50 発見」の成果を報道

2003 年 11 月 12 日 日経産業新聞

「ミトコンドリアタンパク質の輸送に関わる穴の新機能発見」の成果を報道

#### その他

研究成果が, 以下の一般向け教科書に掲載される

Lewin, Cassimeris, Lingappa, and Plopper

Cells, Jones and Bartlett 2007

Karp

Cell and Molecular Biology, Wiley 2005

Voet and Voet

Biochemistry 3rd Edition, Wiley 2004

Pollard and Earnshaw

Cell Biology, Saunders, 2002

#### 阪口グループ

(1) 原著論文発表 (国内誌 0 件, 国際誌 18 件)

Horie, C., Suzuki, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K.

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, 41462-41471 (2003)

Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., and Uozumi, N.  
Topogenesis of two transmembrane type K<sup>+</sup> channels, Kir 2.1 and KcsA.  
J. Biol. Chem. 278, 40373-40384 (2003)

Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., and Uozumi, N.  
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<sup>+</sup> channel, KAT1.  
J. Biol. Chem. 278, 13227-13234 (2003)

Kanki, T., Young, M.T., Sakaguchi, M., Hamasaki, N. and Tanner, M.J.A.  
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, 5564-5573 (2003)

Sato, Y., Hosoo, Y., Sakaguchi, M., Uozumi, N.  
Requirement of negative residues, Asp 95 and Asp 105, in S2 on membrane integration of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel, KAT1.  
Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 923-926 (2003)

Sato, Y., Ariyoshi, N., Mihara, K. and Sakaguchi, M.  
Topogenesis of NHE1: direct insertion of the membrane loop and sequestration of cryptic glycosylation and processing sites just after TM9.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 324, 281-287 (2004)

Suzuki, H., Kadowaki, T., Maeda, M., Sasaki, H., Nabekura, J., Sakaguchi, M., and Mihara, K.  
Membrane-embedded C-terminal segment of rat mitochondrial TOM40 constitutes protein-conducting pore with enriched  $\beta$ -structure.  
J. Biol. Chem. 279, 50619-50629 (2004)

Nakamura, Y., Suzuki, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K.  
Targeting and assembly of rat mitochondrial translocase of outer membrane 22 (TOM22) into the TOM complex.  
J. Biol. Chem. 279, 21223-21232 (2004)

Ikeda, M., Kida, Y., Ikushiro, S., Sakaguchi, M.  
Manipulation of membrane protein topology on the endoplasmic reticulum by a specific ligand in living cells.  
J. Biochem., 138, 631-637 (2005)

Kida, Y., Mihara, K., and Sakaguchi, M.  
Translocation of a long amino-terminal domain through ER membrane mediated by following signal-anchor sequence.  
EMBO J., 24, 3202-3213 (2005)

Sato, Y. and Sakaguchi, M.  
Topogenic properties of transmembrane segments of Arabidopsis thaliana NHX1 reveal a common topology model of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger family.  
J. Biochem., 138, 425-431 (2005)

Miyazaki, E., Kida, Y., Mihara, K. and Sakaguchi, M.  
Switching the sorting mode of membrane proteins from co-translational ER targeting to post-translational mitochondrial import.

Mol. Biol. Cell, 16, 1788-1799 (2005)

Kashiwayama, Y., Asahina, K., Shibata, H., Morita, M., Muntau, A.C., Roscher, A.A., Wanders, R.J.A., Shimozawa, N., Sakaguchi, M., Kato, K., and Imanaka, T.,  
Role of Pex19p in the Targeting of PMP70 to Peroxisome.  
Biochim. Biophys. Acta, 1746, 116-128 (2005)

Kida, Y., Morimoto, F., Mihara, K., and Sakaguchi, M.,  
Function of positive charges following signal-anchor sequences during translocation of the N-terminal domain.  
J. Biol. Chem., 281, 1152-1158 (2006)

Hill, J.K., Brett, C.L., Chyou, A., Kallay, L.M., Sakaguchi, M., Rao, R., and Gillespie, P.G.,  
Vestibular hair bundles control pH with  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)/\text{H}^+$  exchangers NHE6 and NHE9.  
J. Neurosci., 26, 9944-9955 (2006)

Zhang, L., Sato, Y., Hessa, T., von Heijne, G., Lee, J.-K., Kodama, I., Sakaguchi, M., and Uozumi, N.,  
Contribution of hydrophobic and electrostatic interactions to the membrane integration of the Shaker  $\text{K}^+$ -channel voltage-sensor domain.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 8263-8268 (2007)

Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M.  
Two translocating hydrophilic segments of a nascent chain span the ER membrane during multispinning protein topogenesis.  
J. Cell Biol. 179, 1441-1452 (2007)

Tsuchida, M., Emi, Y., Kida, Y., and Sakaguchi, M.  
Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus  
Biochem. Biophys. Res. Commun. in press (2008)

## (2) その他の著作物 (総説, 書籍など)

阪口雅郎

膜タンパク質のトポロジー形成: 小胞体系と小胞体標的化回避  
生化学, 75, 520-528 (2003)

阪口雅郎

小胞体での膜タンパク質の構造形成機構  
実験医学, 21 (細胞内輸送研究の最前線), 1924-1931 (2003)

阪口雅郎, 木田祐一郎

1型シグナルアンカー配列による膜トポロジー形成の研究  
蛋白質核酸酵素 49 (細胞における蛋白質の一生), 899-902 (2004)

阪口雅郎, 木田祐一郎

トランスロコンの孔  
実験医学, 23 (細胞内タンパク質の社会学-合成・品質管理・輸送・分解のケアシステムと疾患発症機構), 2308-2313 (2005)

阪口雅郎

膜タンパク質のフォールディングとポリペプチド鎖の膜透過機構  
タンパク質科学-構造・物性・機能 (化学同人), 279-289 (2005)

阪口雅郎  
生体膜の膜タンパク質構造構築システム  
リボソーム応用の新展開 ~人工細胞の開発に向けて~ (エヌ・ティー・エス), 223-232  
(2005)

阪口雅郎  
膜蛋白質  
バイオインフォマティクス事典 (共立出版), 312-313 (2006)

阪口雅郎  
小胞体での膜蛋白質の生合成と膜結合型リボソーム  
生物物理学ハンドブック (朝倉書店), 205-207 (2007)

(3)学会発表 (国際学会発表及び主要な国内学会発表)  
招待講演 (国内会議4件, 国際会議2件)

阪口雅郎  
膜タンパク質の立体構造と構造形成機構  
第6回ワークショップ「微生物ゲノム研究のフロンティア」  
木更津, 2004年3月1-2日

Sakaguchi, M.  
Biogenesis and topogenesis of Membrane Proteins on the ER membrane  
International Symposium on Frontiers in Bioinformatics: Structure, Interaction and Function  
京都, 2004年2月10日

Sakaguchi, M.  
Membrane Protein Integration into ER via Translocon  
International Symposium on "Life of Proteins"  
淡路, 2005年10月30日-11月3日

阪口雅郎  
Membrane Protein Integration into ER via Translocon  
第25回分子生物学会大会, ワークショップ「タンパク質と脂質のオーケストレーションによる膜の形成」  
福岡, 2005年12月7-10日

阪口雅郎  
膜タンパク質の構造形成とタンパク質膜透過チャネル  
文科省科研費・特定領域研究「膜インタフェイス」・平成17年度公開シンポジウム  
東京, 2006年1月13日

Sakaguchi, M., Kida, Y.  
Flexibility of translocon and driving force for polypeptide chain translocation  
第59回日本細胞生物学会大会, ミニシンポジウム「タンパク質の機能発現と品質管理: サーベイランスとハンドリング」  
福岡, 2007年5月28-30日

阪口雅郎  
トランスロコンを介した膜タンパク質の小胞体膜への組み込み

大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の膜透過と膜挿入の分子メカニズム」  
吹田, 2008年1月24-25日

口頭発表 (国内会議7件, 国際会議0件)

木田祐一郎, 三原勝芳, 阪口雅郎

250 残基可溶性ドメインの SA-I 配列による小胞体膜透過メカニズム

第77回日本生化学会大会・ワークショップ

横浜, 2004年10月13-16日

池田素勉, 木田祐一郎, 生城真一, 阪口雅郎

培養細胞小胞体におけるトランス要因による膜タンパク質トポロジー制御

第78回日本生化学会大会, ワークショップ

神戸, 2005年10月19-22日

森本富美子, 木田祐一郎, 阪口雅郎

小胞体膜タンパク質膜透過の駆動力

第78回日本生化学会大会, ワークショップ

神戸, 2005年10月19-22日

木田祐一郎, 森本富美子, 阪口雅郎

小胞体トランスロコンのポリペプチド鎖収容能力

第78回日本生化学会大会, ワークショップ

神戸, 2005年10月19-22日

Kida, Y., Morimoto, F., Sakaguchi, M.

Translocon accommodates two translocating hydrophilic chains and two transmembrane sequences simultaneously

第59回日本細胞生物学会大会, ワークショップ「タンパク質の一生」

福岡, 2007年5月28-30日

土田 雅史, 木田 祐一郎, 衣斐 義一, 阪口 雅郎

ABC6 はミトコンドリアではなく細胞内分泌経路に局在する

第80回日本生化学会大会・分子生物学会大会合同

横浜, 2007年12月11-15日, 横浜

木田 祐一郎, 森本 富美子, 阪口 雅郎

ポリペプチド鎖小胞体膜透過のシグナルアンカー配列による駆動メカニズム

第80回日本生化学会大会・分子生物学会大会合同

横浜, 2007年12月11-15日

ポスター発表 (国内会議16件, 国際会議3件)

Nakamura, Y., Suzuki, H., Sakaguchi, M., Mihara, K.

Characterization of the signal that directs rat Tom22 to the mitochondrial outer membrane

第76回日本生化学会大会

横浜, 2003年10月15-18日

Kida, Y. Sakaguchi, M., Mihara, K.

Translocation of the 250-residue hydrophilic domain before the SA-I sequence across the ER membrane

第 76 回日本生化学会大会

横浜, 2003 年 10 月 15-18 日

Miyazaki, E., Sakaguchi, M., Mihara, K.

Sorting of hydrophobic membrane protein between mitochondria and endoplasmic reticulum

第 76 回日本生化学会大会

横浜, 2003 年 10 月 15-18 日

Suzuki, H., Kadowaki, T., Nabekura, J., Ueda, T., Sakaki, H., Sakaguchi, M., Mihara, K

Domain structure of the preprotein translocase channel TOM40: the C-terminal half of TOM40 constitutes preprotein binding site with enriched  $\beta$ -structure

第 76 回日本生化学会大会

横浜, 2003 年 10 月 15-18 日

Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., Uozumi, N.

Membrane topogenesis of two transmembrane  $K^+$  channels, Kir2.1 and KcsA

第 76 回日本生化学会大会

横浜, 2003 年 10 月 15-18 日

木田祐一郎, 阪口雅郎, 三原勝芳

200 アミノ酸残基からなる可溶性ドメインの小胞体膜透過

第 3 回日本蛋白質科学会大会

札幌, 2003 年 6 月 23-25 日

宮崎恵美, 阪口雅郎, 三原勝芳

ミトコンドリア内膜 ABC 輸送体 (ABCme) の細胞内局在化と膜トポロジー形成

第 3 回日本蛋白質科学会大会

札幌, 2003 年 6 月 23-25 日

佐藤陽子, 阪口雅郎, 五島志信, 魚住信之

Shaker 型膜電位依存性  $K^+$ チャネルのトポロジー形成における静電荷相互作用の役割

第 3 回日本蛋白質科学会大会

札幌, 2003 年 6 月 23-25 日

Horie, C., Sakaguchi, M. and Mihara, K.

Targeting and assembly of mitochondrial tail-anchored protein Tom5 to the TOM complex depend on a signal distinct from those of tail-anchored proteins dispersed in the membrane

第 56 回日本細胞生物学会大会

大津, 2003 年 14-16 日

宮崎恵美, 木田祐一郎, 阪口雅郎, 三原勝芳

プレ配列による高疎水性膜タンパク質の co-translational な標的化回避および

post-translational なミトコンドリアへの輸送

第 77 回日本生化学会大会

横浜, 2004 年 10 月 13-16 日

Nakamura, Y., Suzuki, H., Sakaguchi, M. and Mihara, K.

Targeting and assembly of rat mitochondrial TOM22 into the TOM complex

第 57 回日本細胞生物学会大会

大阪, 2004 年 5 月 26-28 日

森本富美子, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
Affinity tag を用いた小胞体膜透過制御系の構築  
第 5 回日本蛋白質科学会大会  
福岡, 2005 年 6 月 30-7 月 2 日

木田祐一郎, 森本富美子, 阪口雅郎  
トランスロコンの組み込み途上ポリペプチド鎖の収容特性について  
第 5 回日本蛋白質科学会大会  
福岡, 2005 年 6 月 30-7 月 2 日

Morimoto, F., Kida, Y. and Sakaguchi, M.  
Driving force for protein translocation through the ER membrane  
International Symposium on "Life of Proteins"  
淡路, 2005 年 10 月 30 日-11 月 3 日

Kida, Y., Morimoto, F. and Sakaguchi, M.  
Capacity of translocon pore for polypeptide chains translocating across the ER membrane  
International Symposium on "Life of Proteins"  
淡路, 2005 年 10 月 30 日-11 月 3 日

Kida, Y., Morimoto, F., Mihara, K. and Sakaguchi, M.  
Function of Positive Charges Following Signal-Anchor Sequences during Translocation of the  
N-terminal domain  
20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB  
Congress  
京都, 2006 年 6 月 23 日

木田祐一郎, 森本富美子, 阪口雅郎  
シグナルアンカー配列によって引き起こされるポリペプチド鎖膜透過のメカニズム  
第 6 回日本蛋白質科学会年会  
京都, 2006 年 4 月 24 日

木田祐一郎, 森本富美子, 阪口雅郎  
ポリペプチド鎖小胞体膜透過の膜貫通配列による駆動システム  
第 7 回日本蛋白質科学会大会  
仙台, 2007 年 5 月 24-26 日

土田 雅史, 山下 ゆかり, 小森 雅之, 木田 祐一郎, 阪口 雅郎  
PMP70 分子内の細胞内局在化シグナルの相互関係  
第 80 回日本生化学会大会・分子生物学会大会合同  
横浜, 2007 年 12 月 11-15 日

(4) 特許出願  
国内出願 (0 件)  
  
海外出願 (0 件)

(5)受賞等  
受賞  
なし

新聞報道  
なし

その他  
なし

7 研究期間中の主な活動（ワークショップ・シンポジウム等）  
なし

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開  
なし

(2)実用化に向けた展開  
なし

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果  
なし

(2)領域横断的活動とその効果  
なし

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

本研究では、トランスロケータによる膜を舞台とするタンパク質の配置のメカニズムの  
に関して数多くの発見を成し遂げ、多くの知見を得た。本研究で得られた知見は必ずしも  
応用に直結する技術を提供するものではないが、以下に述べるような、様々な技術開発の  
シーズとなることが考えられる。

まず、本研究で得られた行き先シグナルの実体に関する情報を今後さらに増やしていく  
ことにより、また膜への組込みの配向規則に関する情報をさらに収集していくことにより、  
ゲノム情報に基づくタンパク質の細胞内局在部位の予想、膜タンパク質の膜への組込みの  
配向性の予想の技術の向上に貢献できることが考えられる。後者は、現在全く手がついて  
いない膜タンパク質の構造予測にも欠かすことができない。これらの技術は総合的に、機  
能未知のタンパク質の機能予測に大きく貢献するものと考えられる。今後タンパク質の機  
能予測には、可溶性タンパク質（ドメイン）の構造予測だけでは不十分であり、膜を舞台  
とするタンパク質の配置の予測技術の開発が不可欠であろう。

次に、異種細胞内における組換えタンパク質発現技術の質を大きく変える可能性が期待  
される。すなわち、タンパク質の行き先シグナルとその認識機構の詳細が明らかになりつ  
つあるので、そうした情報を蓄積していくことにより、組換えタンパク質を特定のオルガ  
ネラの特定の区画に、精密かつ自在に送り込むこと、さらに膜タンパク質を特定の配向性  
でオルガネラ膜や細胞膜に組込むことが可能となることが考えられる。こうした技術の進  
歩は、オルガネラ機能や細胞表層機能のキメ細かい制御を可能とするであろう。

in vitro でのタンパク質の機能発現についても、将来の技術革新のシーズとなることが期

待される。今後、トランスロケータを組み込んだ人工膜を、無細胞タンパク質合成系と組み合わせることにより、様々な膜タンパク質を *in vitro* で機能化できるようになることが期待される。トランスロケータを組み込んだ人工膜の利用は、生細胞を用いないタンパク質機能発現の次の大きな目標と言えよう。

さらに本研究の重要な応用の可能性として、トランスロケータを改変することにより、膜を舞台とするタンパク質の配置を人為的にデザインする技術の開発があげられる（既に予備的研究に着手している）。たとえば細胞内でトランスロケータおよびそれが認識するシグナルを同時に改変することにより、特定のオルガネラや細胞表層に送り込むタンパク質群を自在に変えることが可能となる。このような技術はオルガネラの機能改変等、「オルガネラ工学」という新しい応用分野の創出につながるものである。

## (2) 社会・経済の発展が期待される成果

本研究はすぐに実用化される技術を創出するものではないが、上述の技術の発展を通して、社会的価値の向上に資する可能性が考えられる。

### 1.1 結び

本研究では、学術的にはこれまで述べたように、ミトコンドリアと小胞体という2つの膜系・システムを担当した2つのチームが互いに集中的に研究を推進することで、パラダイムシフトを伴う多くの重要な発見を成し遂げることができた。2つのシステムは、共通する側面も多く、ミトコンドリアのシステムで有効だった実験系を小胞体に応用するなど、両チームの連携・協力もうまくいった。*in vitro* および、*in vivo* における部位特異的光架橋法、膜透過を停止・再開するシステム、など有用な実験系の開発の成功も、今後のこの分野の学術的進展に大きく貢献できるものと考えられる。

よって、本研究は当初の目的であったトランスロケータシステムの全貌と作動原理の解明に関して十分な成果をあげることができ、また応用面への足掛かりを得ることもできたと考える。