

「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 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。

#### ミトコンドリアのトランスロケータ

(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

Tim50の発見以降、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を新たに4種類発見した。Tom13とTom38は外膜でβバレルタンパク質のアセンブリーに、Tim40は膜間部へのタンパク質以降に、Tim15はタンパク質の内膜透過に関与する新因子である。

(1-3) トランスロケータチャンネルはただの孔か？

ミトコンドリアタンパク質の外膜透過を担うトランスロケータ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) ミトコンドリア内での仕分け経路の解明を目指し、内膜のTIM22経路の基質は一部を欠くとTIM23経路へと仕分け経路がスイッチすることを見いだした。

今後はミトコンドリア内での仕分け経路の全貌の解明、βバレルタンパク質のアセンブリーの分子機構の解明、膜透過とそれともなうアンフォールディングの原動力の解明を目指す。

#### 小胞体のトランスロケータ

(1-5) 小胞体のトランスロケータの作動原理を明らかにする。

ポリペプチド鎖の動きを制御できる実験系を用いて、小胞体トランスロケータのダイナミクスを解析している。ポリペプチド鎖の膜透過要因として、シグナル配列がチャンネル内に入力する際のストロークが最大駆動要因であることを見出した。またトランスロケータは、多数の膜貫通疎水性セグメントに加え複数の親水性セグメントを、実際に動くことが可能な状態に保持できる、きわめて柔軟なものであることを明らかにした。トランスロケータのダイナミクスと機能制御機構の解明を目指す。

## 2. 研究実施内容

### ミトコンドリアのトランスロケータ

ミトコンドリアへのタンパク質移行は外膜と内膜の複数の膜透過装置（トランスロケータ）によって担われる。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、ほぼすべての因子が同定されたと考えられていたが、われわれのTim50の発見を契機として、未同定因子の再検索がスタートした。われわれは酵母ゲノム情報をフルに利用し、この1年間で新規因子を4つ発見した。Tom38とTom13はミトコンドリア外膜のタンパク質で、Tom38は既知のトランスロケータSAM/TOB複合体の新因子として、 $\beta$ バレル型タンパク質の外膜へのアセンブリーに関わる。Tom13は既知のトランスロケータとは別の複合体を作り、 $\beta$ バレルタンパク質の一部のヘテロ複合体アセンブリーに関わる。Tim40は膜間部にドメインを持つ内膜の内在性タンパク質で、膜間部のsmall Tim等、可溶性低分子量タンパク質の局在化に関わる。Tim15は内膜のマトリクス側に存在する表在性膜タンパク質で、マトリクスの分子シャペロンHsp70と相互作用し、タンパク質の内膜通過に関わる。これらの因子の機能解析を進めることにより、ミトコンドリアへのタンパク質移行の分子機構がさらに詳細に明らかになることが期待される。

ミトコンドリアタンパク質の移行経路は、外膜のTOM複合体を通過した後、各区分への経路へと分岐する。内膜の複数回膜貫通タンパク質は、TOM複合体通過後、膜間部のsmall Timタンパクの働きにより内膜の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と考えられている。そこで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deletion変異体を作成し、ミトコンドリアへの移行経路を調べたところ、TIM22経路ではなく、TIM23経路によりマトリクスにまでミスソートされることがわかった。このことは、PiCはTIM23経路に仕分けられるcrypticな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。

### 小胞体のトランスロケータ

無細胞タンパク質合成系と単離小胞体膜を利用し、小胞体トランスロケータによるポリペプチド鎖の動きを制御し、透過の各段階を解析可能とした。ポリペプチド鎖の移動にATP等の高エネルギー化合物や小胞体内腔の熱ショック蛋白質が関与しないことや、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を明らかにした。また、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を明らかにした。さらに、ストレプトアビジン結合性タグ (SBP-tag) を透過ポリペプチド鎖に付加することによって、より詳細に透過を制御し透過力などを測定できる実験系を確立した。この実験系によって、膜透過駆動力の変動を経時的に計測可能となった。

膜透過一時停止再開実験系を用いて、複数回膜タンパク質の膜組み込み・立体構造形成の過程を追跡可能とした。それによって、小胞体トランスロケータチャンネルの中に複数の膜貫通セグメントが収納された後でも、アミノ末端側の親水性セグメントの膜透過が可能であることが判明した。さらに、複数の膜貫通セグメントに加えて、複数の親水性セグメントが収納され、動くことが可能であることが証明できた。小胞体トランスロコンチャンネルは、古細菌トランスロケータの結晶構造解析から提唱されているような、単一のポリペプチド鎖がようやく収納できる程度のものではなく、柔軟に多数のポリペプチドセグメントを許容できるフレキシブルなものであることが明らかになりつつある。

### 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

#### 兵庫県立大グループ

- ① 研究分担グループ長：阪口 雅郎 (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

#### (1) 論文発表

##### 名大グループ

- 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)

- T. Endo  
Protein transport to and within plant chloroplasts  
Endocytobiosis Cell Res. 15, 294-299 (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)

#### 兵庫県立大グループ

- Y. Sato, N. Ariyoshi, K. Mihara, and M. Sakaguchi.  
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)
- H. Suzuki, T. Kadowaki, M. Maeda, H. Sasaki, J. Nabekura, M. Sakaguchi, and K. Mihara.  
Membrane-embedded C-terminal segment of rat mitochondrial TOM40 constitutes protein-conducting pore with enriched  $\beta$ -structure.  
J. Biol. Chem. 279, 50619-50629 (2004)
- E. Miyazaki, Y. Kida, K. Mihara, and M. Sakaguchi.  
Switching the sorting mode of membrane proteins from co-translational ER targeting to post-translational mitochondrial import.

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