

「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。本研究では、生体膜を舞台とするタンパク質の配置を担うプロテインマシンであるトランスロケータについて、その作動原理を分子レベルで理解することをめざした。

ミトコンドリアのトランスロケータについては、新たなトランスロケータ構成因子が次々に見つかり、その全貌が予想以上に複雑かつ巧妙であることがわかってきた。トランスロケータが基質タンパク質の局在化シグナルをどのように認識し、どのようにトランスロケータ間で受け渡し、膜透過や膜への組み込みを実現しているのかを解析している。トランスロケータ構成因子の機能ドメインについて NMR や X 線構造解析も行っている。小胞体のトランスロケータについては、ポリペプチド鎖の膜透過を制御できる *in vitro* の実験系を用いて、小胞体トランスロケータのダイナミクスを解析、小胞体トランスロケータがポリペプチド鎖の膜透過を駆動するのに、ATP やシャペロンを必ずしも必要としないこと、トランスロケータの構造そのものがきわめて柔軟なものであることが分かってきた。

2. 研究実施内容

ミトコンドリアと小胞体のトランスロケータについて、以下のように研究を実施した。

ミトコンドリアのトランスロケータ

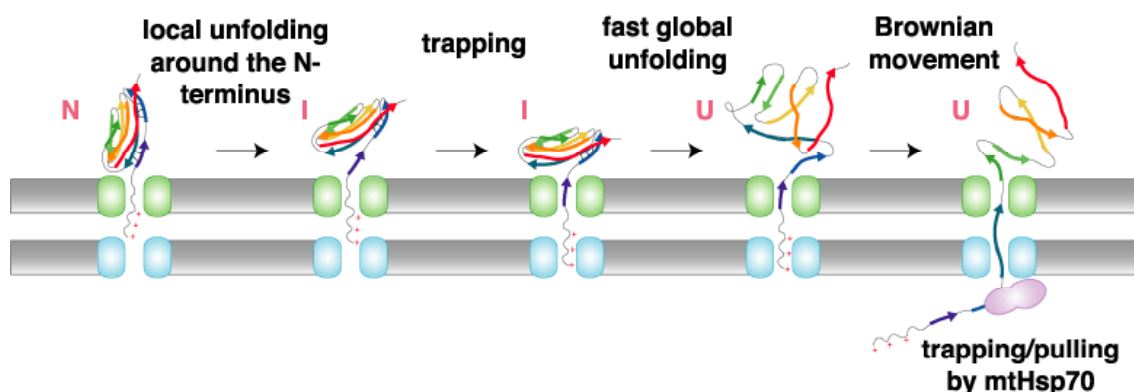
(1) 新規トランスロケータ構成因子の同定

平成 16 年度に引き続き、17 年度は新たに Tim41 を発見した。Tim41 は、ミトコンドリア内膜のマトリクス側に面する表在性膜タンパク質である。Tim41 の遺伝子破壊株は温度感受性致死の表現型を示し、高温で内膜のトランスロケータ TIM23 複合体を経由する内膜やマトリクスの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 TIM23 複合体を経由するマトリクスへのタンパク質移行に関わるものであったが、Tim41 は内膜を通過せず内膜に組み込まれるタンパ

ク質にも影響を与える点でユニークである。詳細に Tim41 の機能を解析した結果、Tim41 は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ことが分かった。このようなトランスロケータのアセンブリーの形成や維持を補助する専門の因子が見つかったのは初めてである。

(2) トランスロケータが基質をアンフォールドする仕組みを解明

トランスロケータの孔は 20-30 Å 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させて、孔を通過させねばならない。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 I27 ドメインの様々な変異体の N 端または C 端にミトコンドリア行きシグナルを付加した融合タンパク質を用い、ミトコンドリアへのインポート速度と原子間力顕微鏡 (AFM) による力学的安定性を比較した。その結果、ミトコンドリアのトランスロケータは、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と相互作用し、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。



(3) ミトコンドリア内膜トランスロケータのプレ配列受容体機能を発見

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、さらにその相互作用は外膜受容体 Tom20 とプレ配列との相互作用よりも強いことが示唆された。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、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。

小胞体のトランスロケータ

(4) 膜透過実験系の改良により、膜透過駆動力とダイナミクスを詳細に解析

小胞体トランスロケータ内のポリペプチド鎖の動きを制御できる実験系をつくり、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た。そしてポリペプチド鎖の移動に、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が明らかになった。さらに、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見いだした。次に膜透過実験系を、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、より詳細に膜透過を制御し膜透過力などを測定できるように改良、小胞体トランスロケータチャネルの中に複数の膜貫通セグメントに加えて、複数のシグナル配列と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などを証明した。また、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であることを見いだした。すなわち、小胞体トランスロコンチャネルは予想以上に柔軟で、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った。

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、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（原著論文）発表

名大グループ

- 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)
- 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 F **61**, 514-517 (2005)
 - 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)

兵庫県立大グループ

- 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)
- 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)
- 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)
- Ikeda, M., Kida, Y., Ikushiro, S. and Sakaguchi, M.
Manipulation of membrane protein topology on the endoplasmic reticulum by a specific ligand in living cells
J. Biochem. **138**, 631-637 (2005)
- Sato, Y. and Sakaguchi, M.
Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na⁺/H⁺ exchanger family
J. Biochem. **138**, 425-431 (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)