

「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、トランスロケータをメンテナンスする因子の発見など、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。マトリクスのもータ因子 Hsp70 のパートナー Tim15 の NMR 構造も決定した。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複数のポリペプチド鎖を同時に収容できることを示し、2つのトランスロケータ孔の協調機能モデルを提唱した。また、透過駆動力の変動とシグナル配列の駆動作用を実証した。

## 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

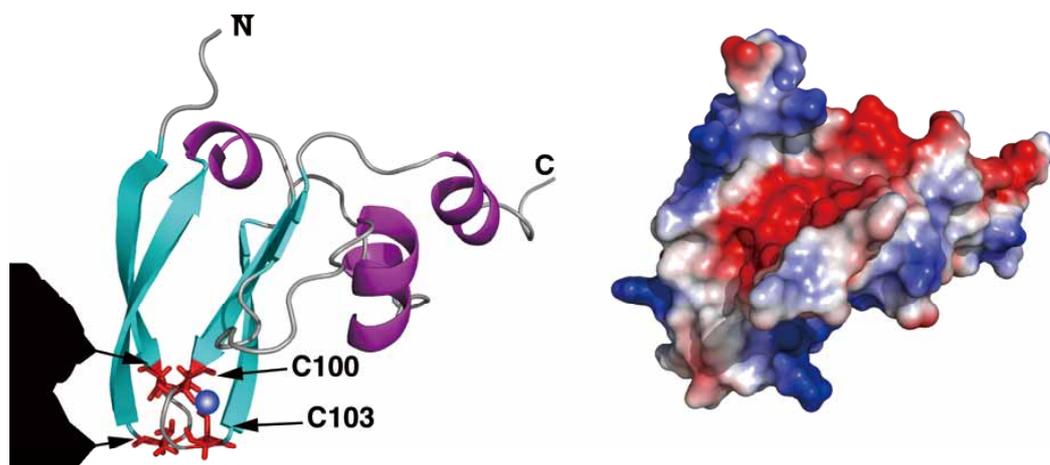
### (1) 新規トランスロケータ構成因子のキャラクタリゼーション

17年度に発見した新因子 Tim41 のキャラクタリゼーションを引き続き行い、その機能から名称を Tam41 に変更した。Tam41 が機能欠損すると、*in vivo* および *in vitro* 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。Tam41 は TIM23 複合体構成因子ではなく、マトリクス側の独立した因子であるが、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。Tam41 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。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。複雑な膜タンパク質複合体は、一般に機能的アセンブリーの維持に Tam41 のようなメンテナンス因子を必要とするのかもしれない。

## (2) Tim15 の NMR 構造の決定

Tim15 は、遠藤らが発見した、ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 複合体のモータ因子 mtHsp70 の補助因子である。Tim15 がどのように mtHsp70 の機能を助けるのかを明らかにするために、Tim15 のコアダメインを大腸菌に発現・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 (下図左)、表面電荷の分布は不均等であった (下図右)。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今後の課題である。



### (3) ミトコンドリア内膜トランスロケータ膜間部ドメインの多重機能の発見

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提案されている（後者は遠藤らが発見）。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、モータ機能にも関わる、多機能デバイス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。

### 小胞体のトランスロケータ

#### (4) 小胞体トランスロケータの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解析した。ストレプトアビジン結合性タグ (SBP-tag) によって、膜透過を制御し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。こうして形成された中間状態では、親水性セグメントがいずれもトランスロケータサブユニット内に存在していることを、化学架橋反応を用いて示した。また、透過開始時点で働く引き込み駆動力を評価し、透過初期の駆動作用による自由エネルギー低下は親和性  $K_D=10^{-8}M$  とつりあう程度であること、力学的アンフォールディング現象との対比によりアミノ末端ドメインに対する透過駆動力は 150 ~ 200pN 程度であることを明らかにした。複数の実験手法を用い、透過駆動力はシグナル配列がトランスロケータに進入する段階を過ぎると低下することを示した。さらに、膜透過駆動力がシグナル配列の特性に依存することを発見し、シグナル配列が小胞体標的化や配向決定の作用以外に膜透過の駆動力そのものを供給することを示した。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 名大グループ

##### ① 研究者名

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

#### (2) 「兵庫県立大」グループ(小胞体トランスロケータ)

##### ① 研究者名

阪口 雅郎(兵庫県立大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. 研究成果の発表等

#### (1) 論文発表(原著論文)

##### 名大グループ

- 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)

##### 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)
- 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 (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)/H<sup>+</sup> exchangers NHE6 and NHE9  
*J. Neurosci.*, **26**, 9944-9955 (2006).