

## ミトコンドリアタンパク質の交通管制機構とその改変

Control and alteration of mitochondrial protein traffic

遠藤 斗志也 (Toshiya Endo)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授



### 研究の概要

1000種類以上のミトコンドリアタンパク質がミトコンドリア内の目的区画に正しく移行する交通管制システムの全貌を解明するとともに、それを担うトランスロケータの構造を明らかにし、それらが作動する原理、動的に相互作用することで基質を正確かつ効率よく目的区画に仕分ける仕組みを解明する。交通管制システムの改変も試みる。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞小器官，タンパク質輸送

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞内でタンパク質は、生体膜で仕切られたオルガネラに集合して半自律的システムをつくり、複雑な細胞機能を分散管理している。細胞にはこうしたタンパク質群の移動や集合を実現し、維持する交通管制システムが存在し、その中心的役割を担うのがトランスロケータである。ミトコンドリアは二枚の生体膜に囲まれているため、特に交通管制の制御は複雑である。

### 2. 研究の目的

酵母ミトコンドリアをとりあげ、その多様なトランスロケータの全貌と動態を把握する。各トランスロケータ構成因子の構造決定を目指し、トランスロケータの作動原理の一般性と特異性を明らかにし、トランスロケータ間の連携プレーによる交通管制のメカニズムの全貌を解明することをめざす。さらに「行き先シグナル」と受容体の改変による、交通管制機構の改変も試みる。

### 3. 研究の方法

(1) 酵母の増殖に必須のミトコンドリアタンパク質のなかから未同定の新因子を探索。(2) トランスロケータのサブユニット、機能ドメインについて構造決定を試みる。(3) 受容体サブユニットによる基質認識機構を解明。基質認識モチーフを検索するためにペプチド合成機を購入。(4) トランスロケータ間相互作用に欠陥のある変異株を作成すると共に、相互作用を FRET 等でモニターする実験系を構築。(5) 「行き先

シグナル」と受容体の同時改変を試みる。

### 4. これまでの成果

(1) 新因子 Tam41 の発見 Tam41 は酵母からヒトまでの幅広い生物種間で保存され、内膜のマトリクス側に位置する表在性膜タンパク質である。Tam41 を欠損した酵母株は温度感受性増殖を示し TIM23 複合体経路のタンパク質の Tam41 欠損ミトコンドリアへの取り込みの欠損が観察された。Tam41 が欠損すると TIM23 複合体のコア複合体の構造が変化し、モータータンパク質群の TIM23 コア複合体へのアセンブリーに欠損が生じた。したがって、Tam41 は TIM23 複合体の動的な機能構造を維持するために必要なメンテナンス因子であることが示唆された。

(2) Tom20 と Tom22 による協調した「行き先シグナル」認識 外膜トランスロケータ TOM40 複合体のプレ配列受容体サブユニット Tom22 と Tom20 各々について、膜貫通配列と受容体ドメインの間に TEV プロテアーゼ認識サイトを導入し、ミトコンドリアを単離後、TEV プロテアーゼで処理することにより、Tom20, Tom22 のどちらかの受容体ドメインのみを除去する実験系を構築した。この実験系を用いて、様々なミトコンドリアタンパク質前駆体のミトコンドリアへのインポートの Tom20 依存性と Tom22 依存性を詳細に調べたところ、プレ配列が作る両親媒性ヘリックスの疎水面を Tom20 が、親水面を Tom22 が認識することが示唆された。

(3) TOM40 複合体と TIM23 複合体の連携 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、コイルドコイルを作って相互作用する。そこで両者のコイルドコイル領域の各種変異体を多数作成し、インポートへの影響を解析した。その結果、膜間部における Tim23-Tim50 相互作用は、外膜から内膜への前駆体の受け渡し、およびマトリクス側でのモータ機能の制御という2つの重要な役割を担うことが明らかになった。TIM23 複合体のインテリジェントな膜透過装置としての機能、他のトランスロケータとの連携に関する理解が深まった。

(4) モータ補助因子 Tim15 の構造決定 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 の機能を明らかにするために、Tim15 のコアドメインの NMR 構造を決定した。決定された NMR 構造の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た。その結果、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。

(5) 外膜行きシグナルとマトリクス/内膜行きシグナルの優位性解析 Tom40 などのミトコンドリア外膜の  $\beta$  バレル型膜タンパク質は、外膜の TOM40 複合体を通過して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。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、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ことが明らかになった。

(6) 受容体 Tom20 の改変 外膜トランスロケータ TOM40 複合体の受容体サブユニット、Tom20 のシグナル結合部位に変異を導入し、既存のミトコンドリア行きシグナルが認識されないような改変 Tom20 候補を作成した。この改変 Tom20 は、トランスロケータの全体構造や他のサブユニットの発現量には影響を与えず、ミトコンドリア行きシグナルの認識にのみ欠損が生じていると考えられた。

## 5. 今後の計画

現在の研究を進め、ミトコンドリアタンパク質の交通管制システムの全貌とその分子機構を解明する。特にトランスロケータ構成因子の構造決定にさらに力を注ぐ。また現在準備段階である、FRET によるトランスロケータ間相互作用の解析、受容体だけでなくプレ配列側も同時改変し、ミトコンドリアタンパク質の交通管制システムを人為的に改変することを試みる。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む) (研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、 連携研究者は一重下線)

1. Y. Tamura, Y. Harada, T. Shiota, K. Yamano, K. Watanabe, M. Yokota, H. Yamamoto, H. Sesaki, and **T. Endo** (2009) Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *J. Cell Biol.* 184, 129-141.
2. T. Oguro, K. Yagawa, T. Momose, T. Sato, K. Yamano, and **T. Endo** (2009) Structural stabilities of different regions of the titin I27 domain contribute differently to unfolding upon mitochondrial protein import. *J. Mol. Biol.* 385, 811-819.
3. K. Yamano, M. Kuroyanagi-Hasegawa, M. Esaki, M. Yokota, and **T. Endo** (2008) Step size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation. *J. Biol. Chem.* 283, 27325-27332.
4. K. Yamano, Y. Yatsukawa, M. Esaki, A. E. A. Hobbs, R. E. Jensen, and **T. Endo** (2008) Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* 283, 3799-3807.
5. T. Saitoh, M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, **T. Endo**, and D. Kohda (2007) Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* 26, 4777-4787.
6. T. Momose, C. Ohshima, M. Maeda, **T. Endo** (2007) Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. *EMBO Rep.* 8, 664-670.
7. Y. Tamura, Y. Harada, K. Yamano, K. Watanabe, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and **T. Endo** (2006) Identification of Tam41 maintaining integrity of the TIM23 protein translocator complex in mitochondria. *J. Cell Biol.* 174, 615-623.

ホームページ等

<http://biochem.chem.nagoya-u.ac.jp/index.html>