

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18107003

研究課題名(和文) ミトコンドリアタンパク質の交通管制機構とその改変

研究課題名(英文) Control and alteration of mitochondrial protein traffic

研究代表者

遠藤 斗志也 (Toshiya Endo)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70152014

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. 研究計画の概要

真核生物の細胞内でタンパク質は、生体膜で仕切られた区画(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、維持する巧妙な交通管制システムが存在する。オルガネラを生合成し、維持するためには、細胞内で合成される膨大なオルガネラタンパク質を正確にオルガネラに移行させ、オルガネラ内の適切な部位に配置し、正しい高次構造、複合体形成、膜配向を実現しなければならない。この役割を担うのが各オルガネラ膜上のトランスロケータである。トランスロケータは、基質タンパク質自身に書き込まれた「行き先シグナル」を読み取り、オルガネラ膜を舞台とするタンパク質の適切な配置を実現する。本研究では、申請者らがこれまで行ってきた研究を発展させて、ミトコンドリアの多様なトランスロケータの全貌と動態を緊急に把握し、続いて各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関係プレーによるタンパク質の交通管制のメカニズムの全貌を解明することを目指す。さらにそれらの知見に基づき交通管制システムを人為的に改変し、オルガネラへのタンパク質の流れをバルクで操作することを試みる

2. 研究の進捗状況

(1) 新因子 Tam41 の発見

TIM23 複合体経路のタンパク質移行に関与する新規因子として、Tam41 を新たに同定した。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 を欠損した酵母株の表現型および、欠損株のミトコンドリアを用いた *in vitro* インポート実験から、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

ミトコンドリアタンパク質プレ配列中の局在化シグナルを認識する二つの受容体 Tom20 と Tom22 の役割分担を明らかにするために、Tom22 と Tom20 各々について、*in vitro* でミトコンドリア単離後、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、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、両者はすべての前駆体について、極めてよく似ていた、このことは Tom20 と Tom22 がおそらく同時にプレ配列を認識すること、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 が認識する可能性を示唆する。

(3) TOM40 複合体と TIM23 複合体の連携

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。そこでこの相互作用の意義を検討するために、Tim23-Tim50 相互作用が弱くなる *tim23*, *tim50* 変異体として、膜間部ドメインのコイルドコイル構造のアミノ酸置換変異体を作成した。その結果、Tim23-Tim50 相互作用が、前駆体タンパク質の TOM40 複合体から TIM23 複合体への受け渡しに重要である事を見だし

た。さらに、膜間部における Tim23-Tim50 相互作用が、おそらく TIM23 複合体の全体構造に影響を与えることにより、内膜の反対側であるマトリクスに局在するモータータンパク質の機能を制御することも明らかにした。

(4) モーター補助因子 Tim15 の構造決定

ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 複合体のモーター因子 mtHsp70 の補助因子である Tim15 の機能を明らかにするために、Tim15 のコドメインを大腸菌に発現・調製し、その NMR 構造を決定した。決定された構造に基づき、様々な変異体をつくって解析した結果、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

マトリクスや内膜、膜間部に移行する前駆体部分を外膜βバレル型膜タンパク質 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。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。

(6) 受容体 Tom20 の改変

ミトコンドリアタンパク質のプレ配列受容体である Tom20 を改変し、野生型 Tom20 には依存せず、改変 Tom20 にのみ依存してミトコンドリアに取りこまれるような新規プレ配列を選別する酵母スクリーニング系の構築を試み、現在改変 Tom20 に認識される変異プレ配列の探索を行っている。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
進捗状況の (1)-(4) は論文として発表し、(5) も現在論文の改訂中である。したがって、順調に進展していると判断した。

4. 今後の研究の推進方策

本研究の研究計画で掲げた目標の多くは順調に進展しているが、(1) FRET 等を用いたトランスロケータ間、トランスロケータ・関連因子間の動的相互作用の解析と、(2) 受容体と行き先シグナルの同時改変については、ま

だ進行中なので、今後条件検討も含め、さらに遂行していきたい。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件) すべて査読有り

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. 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.

3. 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.

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

5. 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.

他

[学会発表] (計 17 件)

1. Toshiya Endo: Coordinated functions of mitochondrial translocator proteins for protein translocation across and into the membranes. EMBO Conference on Control, Co-ordination and Regulation of Protein Targeting and Translocation. Saint Maxime, France 2008.10.25-29 他

他

[図書] (計 1 件)

著書

1. T. Endo (2009) Control and alteration of protein traffic in the cell. in *Systems Biology - The Challenge of Complexity* (eds. S. Nakanishi, R. Kageyama, and D. Watanabe) pp129-134, Elsevier Science, Amsterdam.