

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B) (一般)  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19H03183  
研究課題名(和文) トランスロコンとモーターのメガコンプレックス群が司る葉緑体蛋白質の包膜透過機構

研究課題名(英文) Elucidation of Molecular Mechanisms of Protein Translocation across the Chloroplast Envelope

研究代表者  
中井 正人 (Nakai, Masato)  
大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：90222158  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：葉緑体は、数千の葉緑体蛋白質が正しく葉緑体内へ運ばれることにより維持される。この輸送は外包膜と内包膜の蛋白質膜透過装置、TOCおよびTICと、Ycf2輸送モーターによって行われている。これらメガコンプレックスがどのように連動して葉緑体蛋白質をサイトゾル側からストロマ側まで輸送しているのかについては、個々の複合体の立体構造レベルの情報が得られておらず、多くが未解決の問題として残されている。本研究では、どの材料が、構造解析に適したサンプルか、デタージェントの種類や塩濃度などの可溶化条件、タグ精製の樹脂の検討、アフィニティ精製前の前処理ステップの効果、最終濃縮方法、などについても検討を進めた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

葉緑体への蛋白質輸送機構の構造レベルでの理解は、生命が光合成に特化した細胞内小器官としての葉緑体をいかに獲得してき得たのか、その根源の理解に必須の研究課題である。本研究成果を足掛かりとして、この精密な分子装置の構造機能連関の全容の解明に一步近づいたと言える。

研究成果の概要(英文)：Majority of nuclear-encoded chloroplast proteins are synthesized in the cytosol as a larger preprotein and are then translocated across the outer and inner envelope membranes through TOC and TIC, respectively. Complete translocation of preproteins across the inner envelope membrane to the stroma occurs with the help of a TIC translocon-associated import motor at the stromal side of the inner envelope. Structural details of these mega complexes have still to be investigated. For this sake, we have tried to establish the method to obtain adequate purified complexes for cryoEM structural studies in both quality and quantity.

研究分野：植物分子細胞生物学

キーワード：葉緑体 タンパク質輸送 タンパク質膜透過

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

葉緑体は、数千の葉緑体蛋白質が正しく葉緑体内へ運ばれることにより維持される。この輸送は外包膜と内包膜の蛋白質膜透過装置、TOC および TIC と、Ycf2 輸送モーターによって行われている。われわれは TIC と Ycf2 輸送モーターがそれぞれ 1 メガダルトン、2 メガダルトンという膜蛋白質複合体であることを明らかにし、すべての構成因子を決定した (Plant Cell 2018, Science 2013)。また TOC 複合体も 1 メガダルトンの複合体であることを報告している (Plant Cell Physiology 2006)。

しかしながら、これらメガコンプレックスがどのように連動して葉緑体蛋白質をサイトゾル側からストロマ側まで輸送しているのかその詳細な分子メカニズムについては、個々の複合体の立体構造レベルの情報が得られておらず、多くが未解決の問題として残されている。

### 2. 研究の目的

本研究計画の究極の目的は、植物を支える葉緑体の形成の根幹メカニズムである蛋白質輸送機構の全容を解明する点にある。葉緑体が有する光合成システムは、数千の葉緑体蛋白質が正しく葉緑体内へ運ばれアセンブリーすることにより維持されている。この輸送は ATP の加水分解エネルギーを必要とし、外包膜と内包膜の蛋白質膜透過装置、TOC および TIC トランスロコンと、Ycf2 輸送モーターによって行われている。本研究計画では、これらの個別のメガコンプレックス、さらにはそれらの複合メガコンプレックスについて、クライオ電顕を用いた単粒子構造解析に適したサンプル調製方法を様々な角度から検討し、最終的にその手法を確立する事を目標とした。

### 3. 研究の方法

上述の葉緑体外包膜および内包膜の蛋白質膜透過の過程に関わるメガコンプレックスの精製に適した出発材料として、各メガコンプレックスの中心コンポーネントに精製用のタグ配列を付加した形質転換植物が、タバコ、およびシロイヌナズナにおいて、作製されている。そこで、これらのどの材料が、質、量、ともに構造解析に適したサンプルとなりうるのか、再検討する。さらに、新たに精製用のタグを付加した形質転換体数種類のスクリーニングや、デタージェントの種類や塩濃度などの可溶化条件、タグ精製用の樹脂の検討、アフィニティ精製前の前処理ステップの効果、最終の濃縮方法、などについても検討を進めた。

### 4. 研究成果

本研究を推進する過程において、作成してきたタグ付加型の植物形質転換体は概ね出揃い、それを用いた詳細な精製方法の比較を進めることができた。それぞれのタグに応じた精製方法を検討する一方で、タグ付加が複合体の発現量や安定性に与える影響も検討した。また、複数のデタージェントの使用濃度やその組み合わせも、可溶化実験において試すことができ、それぞれの最終精製物の収量や純度に与える効果についても比較した。特に、精製に用いるアフィニティ樹脂については、リガンドとタグの相性に重点を置いた検討に加えて、リガンドを結合している樹脂を形成する担体自身の形状や性質にも着目した。というのは、本研究がターゲットとする蛋白質の輸送装置は 1 メガダルトン、2 メガダルトンと、非常に巨大であり、したがって、樹脂担体の排除限界やリガンドとの立体障害がそのアフィニティ結合容量に大きく影響することが予想されたためである。実際、同じリガンドを持つアフィニティ樹脂でも、排除限界の小さい担体では、複合体精製量が著しく低かった。またリガンド自身も、より分子サイズの小さいものに変更した方が、精製量が増加した。

以上の結果をふまえ、市販されているアフィニティ樹脂に頼るだけではなく、自前でより効果的なアフィニティ樹脂の調製にも挑戦してきた。さらに、アフィニティ精製と組み合わせるサンプルの前処理や、最終標品の濃縮方法においても、条件を詰めることができた。以上の精製条件の検討により、ほぼ精製方法の確立を終え、実際に精製サンプルを用いたクライオ電顕観察と単粒子解析のステップに進んでいる。複合メガコンプレックスについても、精製方法確立の最終的な詰め段階に入っている。

本研究の進行の過程において副産物として、TIC メガコンプレックスにおいて、これまでの研究により見落としていた分子量が比較的小さい必須因子 Tic12 を同定し、その機能的な重要性について、詳細な生化学的解析、および、分子遺伝学的解析を駆使することで、明らかにすることができた。またこれらの解析とは並行して、国際共同研究として進めていた緑藻における輸送装置の生化学的解析により、我々が緑色植物において見出していた輸送装置とほぼ同一のものが、存在していることが明らかとなった。さらには、緑色植物との進化的比較という観点から、非常に興味深い位置にある紅藻類の輸送装置に関して、緑色植物の TOC とは全く異なる装置が働いている可能性を示唆する研究成果を挙げる事が出来た。これらの研究成果は、葉緑体蛋白質輸送の分子機構とその進化的成立過程の全容を理解する上で極めて重要であると考えている。

<引用文献>

Zhao X, Higa T, Nakai M. Tic12, a 12-kDa essential component of the translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts in Arabidopsis. *Plant Cell* (2022) 34(11):4569-4582. doi: 10.1093/plcell/koac240. PMID: 35929083

Ramundo S, Asakura Y, Salomé PA, Strenkert D, Boone M, Mackinder LCM, Takafuji K, Dinc E, Rahire M, Crèvecoeur M, Magneschi L, Schaad O, Hippler M, Jonikas MC, Merchant S, Nakai M, Rochaix JD, Walter P. Coexpressed subunits of dual genetic origin define a conserved supercomplex mediating essential protein import into chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.*(2020)117(51):32739-32749.doi: 10.1073/pnas.2014294117. Epub 2020 Dec 3.PMID: 33273113

Baek S, Imamura S, Higa T, Nakai Y, Tanaka K, Nakai M. A distinct class of GTP-binding proteins mediates chloroplast protein import in Rhodophyta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2022) 119(34):e2208277119. doi: 10.1073/pnas.2208277119. PMID: 35969755

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ramundo Silvia, Asakura Yukari, Salome Patrice A., Strenkert Daniela, Boone Morgane, Mackinder Luke C. M., Takafuji Kazuaki, Dinc Emine, Rahire Michele, Crevecoeur Michele, Magneschi Leonardo, Schaad Olivier, Hippler Michael, Jonikas Martin C., Merchant Sabeeha, Nakai Masato, Rochaix Jean-David, Walter Peter	4. 巻 117
2. 論文標題 Coexpressed subunits of dual genetic origin define a conserved supercomplex mediating essential protein import into chloroplasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 32739 ~ 32749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2014294117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakai Masato	4. 巻 32
2. 論文標題 Reply: The Revised Model for Chloroplast Protein Import	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 543 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1105/tpc.19.00821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhao Xueyang, Higa Takeshi, Nakai Masato	4. 巻 34
2. 論文標題 Tic12, a 12-kDa essential component of the translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 4569 ~ 4582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/plcell/koac240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baek Sanghun, Imamura Sousuke, Higa Takeshi, Nakai Yumi, Tanaka Kan, Nakai Masato	4. 巻 119
2. 論文標題 A distinct class of GTP-binding proteins mediates chloroplast protein import in Rhodophyta	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 2208277119 ~ 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2208277119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masato Nakai
2. 発表標題 More surprises in chloroplast protein import
3. 学会等名 EMBO Workshop "New challenges in protein translocation across membranes" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>緑色植物界に共通する葉緑体形成メカニズムを解明：緑藻から植物へと受け継がれた仕組み  <a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2020/20201207_1">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2020/20201207_1</a></p> <p>葉緑体形成に必須なタンパク質輸送装置の 中核を担う新たな因子を発見  <a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2022/20220809_2">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2022/20220809_2</a></p> <p>紅藻など非緑藻類に広く分布する 新たな葉緑体タンパク質輸送因子を発見  <a href="https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2022/20220823_3">https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2022/20220823_3</a></p>
--

6. 研究組織			
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California, San Francisco	University of California, Los Angeles	Princeton University	
スイス	University of Geneva			
ドイツ	University of Munster			