

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15043

研究課題名（和文）ミトコンドリア外膜 バレル型膜タンパク質の新規シグナル認識因子の同定

研究課題名（英文）Identification of Novel Signal Recognition Factors for Mitochondrial beta-barrel Membrane Proteins

研究代表者

ジャーマニー エドワード（Germany, Edward）

宮崎大学・フロンティア科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00866767

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）： バレル型膜タンパク質は、グラム陰性菌、ミトコンドリア、葉緑体の外膜に存在する特殊な構造をとる膜タンパク質である。これらの立体構造形成と膜挿入はアセンブリーと呼ばれ、バレル型膜タンパク質を持つ生命にとって必須である。これらは、輸送装置によって、タンパク質に存在するシグナルが認識されることによって実施される。しかし、これ以外で顕著なアセンブリーメカニズムというのは不明である。本研究では、そのほかの分子機構を探索するために、輸送されるタンパク質と輸送装置の相互作用に着目した。その結果、バクテリアにおいてInternalシグナルを発見し、これがミトコンドリアにも存在することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、バクテリアにおけるInternalシグナルの発見、及びそれがミトコンドリアに保存されていることを見出した。バレル型膜タンパク質のアセンブリーは、バクテリアでは抗菌薬の標的となりうるが、ミトコンドリアにも同様のシステムが存在するため副作用の可能性が指摘されている。今回、バクテリアとミトコンドリアの両方で解析したことで、その相違点、類似点を列挙することができた。これらの情報は、副作用の少ないバレル型膜タンパク質のアセンブリー阻害薬の開発に重要な情報を提供しうる。

研究成果の概要（英文）： -barrel membrane proteins are membrane proteins with unique structures found in the outer membranes of Gram-negative bacteria, mitochondria and chloroplasts. Their conformation and membrane insertion, known as assembly, are essential for life with -barrel membrane proteins. They are carried out by the recognition of the beta signal present in the protein by the transport machinery. However, other prominent assembly mechanisms are unknown. In this study, we focused on the interaction between the transported protein and the transport apparatus in order to explore other molecular mechanisms. As a result, an internal signal was found in bacteria and this was confirmed to be present in mitochondria.

研究分野：蛋白質科学

キーワード： バレル型膜タンパク質 大腸菌 ミトコンドリア 蛋白質輸送

1. 研究開始当初の背景

β バレル型膜タンパク質は、グラム陰性菌の外膜、もしくは、ミトコンドリアや葉緑体といったバクテリアを起源とするオルガネラの外膜に存在するタンパク質である。これらの膜貫通領域は、 β ストランドが樽状の構造をとる。この膜貫通領域の構造形成と膜挿入は総じてアセンブリーと呼ばれ、それぞれの β バレル型膜タンパク質が機能する上で必須のプロセスである。これらは、グラム陰性菌では、Beta-barrel Assembly Machinery (BAM)複合体、ミトコンドリアでは、Sorting Assembly Machinery (SAM)複合体と呼ばれるタンパク質で構成された分子装置によって行われる。 β バレル型膜タンパク質は最もC末端側の β ストランドに「 β シグナル」と呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を有する。この部分が、輸送装置に認識されることで、アセンブリー反応が開始することは明らかになっていた。具体的には、BAM複合体のBamA、SAM複合体のSam50と呼ばれる中心的なサブユニットに存在するラテラルゲートと呼ばれる触媒部位において β シグナルが結合することがアセンブリーに重要である。この部位に結合できる化合物は、ダロバクチンと呼ばれる物質をはじめとして抗菌薬として利用できるものである。一方で、「ラテラルゲート」と「 β シグナル」の関係以外の輸送装置と基質の相互作用については不明であり、アセンブリーの全体像については不明な点が多かった。

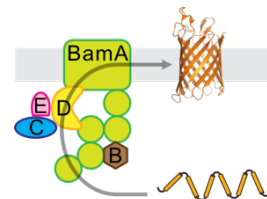


図1: BAM複合体

2. 研究の目的

本研究では、 β シグナルとラテラルゲートのような関係をグラム陰性菌やミトコンドリアで見出し、その相違点、類似点を明らかにすることで、それぞれの分子機構と、進化的な意義を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

本研究では、以下の方法によってアセンブリーの分子機構の解明を目指した。

a) EMM アセンブリーアッセイ

この手法は、大腸菌から極めて短時間で調製した膜画分、*E. coli* Microsomal Membrane :EMMを用いて行う *in organello* 再構築実験系である。EMMは簡便かつ短時間で調整できるため、タンパク質複合体などの活性が保たれており、その膜画分中に存在するタンパク質複合体による反応が再現できる。また、EMMは大量調整が可能であり、 -80°C で保存可能であるため一貫して実験できる利点を持つ。このEMMに対して、*in vitro*で放射性ラベルした状態で合成した輸送すべきタンパク質などを外部から添加することで、その輸送を再構築することができる。この方法では、*in vitro*系の特徴である微細な温度変化などの調整が可能であり、多様な条件での輸送が解析できる。特に本研究では、外部から基質を部分的に合成したペプチドを添加しての競合阻害実験や、シグナル変異体を基質として用いた輸送影響を調べる実験を行った。

b) 部位特異的光架橋法

この手法は、タンパク質の任意の部位のアミノ酸を光架橋側鎖を持つBPAと呼ばれる非天然アミノ酸に置換して行う架橋実験である。BPAの導入はアンバーコドンと呼ばれる終止コドンで最も使用頻度が低いものをアミノ酸用のコドンとして設定して行う、サプレッサーtRNA法を用いることで、*in vivo*で行える。したがって、*in vivo*でBPAを持つタンパク質が通常のタンパク質と同じように細胞内で振る舞うことで、本来相互作用するタンパク質などと近接する。その際に紫外線を細胞外から照射することで、近接状態を架橋という形で固定化することができる。さらに、大腸菌でこれらを発現させ精製することで、*in vitro*での相互作用解析も行える。すなわち、紫外線照射だけでタンパク質間相互作用をアミノ酸残基レベルの空間分解能で解析できる。

c) ミトコンドリアインポート実験

本研究では、ミトコンドリアを単離するためのモデル生物として出芽酵母を用いた。出芽酵母からのミトコンドリア単離法は確立されており、大量培養可能なため、一度に精度の高いミトコンドリアの調製が行える。このミトコンドリアに対して、EMMアセンブリーアッセイと同様に *in vitro*合成した放射性アミノ酸を含む基質タンパク質を加えることで、輸送を再構築できる。今回は β バレル型膜タンパク質の輸送解析のために、Tom40と呼ばれるタンパク質を基質として用いた。このタンパク質はミトコンドリア外膜のタンパク質輸送装置TOM複合体の主要なサブユニットの一つで、SAM複合体とともにある輸送中間体を経て、輸送が行われるため、SAM複合体への認識や、その後のアセンブリーの効率を分けて評価することができる。

これらの代表的な手法に加えて、大腸菌や酵母の生育比較などの一般的な微生物学的手法、及びプルダウンアッセイなどの一般的な生化学的な実験手法を用いた解析を用いた。

4. 研究成果

① グラム陰性菌のβバレル型膜タンパク質に存在する新規シグナルの発見

βシグナルとラテラルゲートに相当する基質と輸送装置の相互作用を発見するため、EMM アセンブリーアッセイに基質の部分的なペプチドを添加して、放射性ラベルされた基質タンパク質のアセンブリーを阻害できる部分を探索した。その結果、βシグナル部分以外でも BAM 複合体に親和性を示し、基質の輸送を阻害できる部分を見出した。これらのペプチドが存在する領域を精査したところ、βシグナルと同じ配向を示すC末端付近に存在するβストランドであった。この部分で高度に保存されているアミノ酸を確認し、その部位に変異を導入した場合、ENMM アセンブリーアッセイではアセンブリーに影響があることを確認した。すなわち、これらの領域および保存されているアミノ酸はシグナルとして機能することを突き止めた。このシグナルは最もC末端側に存在するβシグナルに対して、「Internal シグナル」と命名した。

この Internal シグナルがどのような役割を担っているかを詳細に解析したところ、シグナルに変異がある場合、BAM 複合体からの乖離が遅れることがわかった。このような場合、BAM 複合体との相互作用に影響があることが考えられるため、Internal シグナルと相互作用する BAM 複合体のサブユニットの同定を行ったところ、BamD というサブユニットであった。BamD は、BamA と同様大腸菌の生育に必須なタンパク質である。このサブユニットと、基質の相互作用を部位特異的光架橋法により詳細に確認したところ、BamD はβシグナルと Internal シグナルの両方を認識することで、この部分の基質の立体構造形成を促進し、ラテラルゲートへ効率的に構造形成した基質を受け渡す準備をしていることがわかった。この機能は、大腸菌外膜に必要な大量の外膜タンパク質を効率よく輸送するための重要な分子機構であり、これが失われると外膜の組成の変化から抗菌薬などに対するバリア機能が失われるということがわかった。以上の成果は、eLife 誌に発表した。

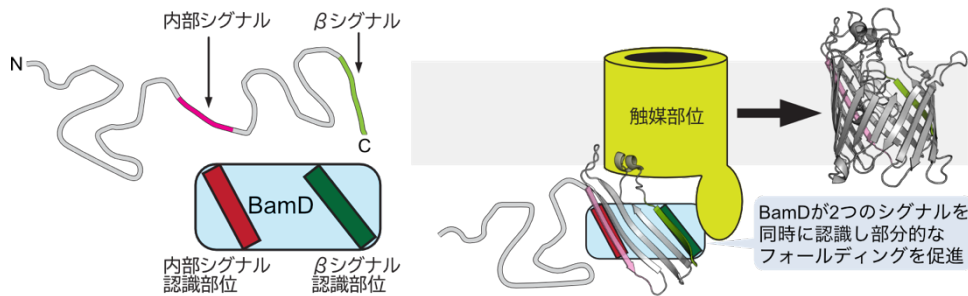


図2:シグナルとBamDによるアセンブリー促進機構

② ミトコンドリアのβバレル型膜タンパク質中の Internal シグナルの役割の検討

大腸菌を用いて明らかにした Internal シグナルがミトコンドリアのβバレル型膜タンパク質に存在するかどうかを確認したところ、同様のアミノ酸配列が保存されていることがわかった。これらがシグナルとして機能していればアセンブリーに影響が出るはずである。これらのシグナルについて変異体を作成し、ミトコンドリアインポート実験で確認したところ、アセンブリーの遅延、特に SAM 複合体との相互作用に影響がみられ、アセンブリー効率の低下がみられた。一方で、SAM 複合体と相互作用できたものについては、通常の経路で同様の効率でアセンブリーされたことから、輸送装置である SAM 複合体との輸送中間体に影響がみられたことから、バクテリアと同様に輸送装置との相互作用に重要なシグナルであることがわかった。これらのシグナル領域と相互作用するタンパク質を部位特異的光架橋法で調べるために、シグナル部位を酵母細胞内で発現させるコンストラクトを作成し、これがミトコンドリアに輸送されるかを確認した。その結果、シグナル領域だけではミトコンドリアへと輸送される相互作用タンパク質の探索に利用できなかった。そこで、Tom40 のシグナル部分に変異を導入し、別の部位にBPAを導入し、架橋実験を行った。その結果複数の架橋産物を得ることができた。これらの架橋産物を質量分析によって解析したところ複数の候補物質を得た。しかしながら、現在これらの候補物質の遺伝子欠損株において明確な輸送効率の低下は確認できていない。現在引き続き、シグナル部位に結合するタンパク質の探索を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Edward Germany
2. 発表標題 From BAM to SAM, a conserved rule that regulates - barrel membrane protein assembly
3. 学会等名 Nebraska univ seminar series
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 エドワード ジャーマニー, 中島 由香里, 塩田 拓也
2. 発表標題 BamD-Dependent Substrate Recognition Facilitates Outer Membrane Sorting and Insertion of Beta-Barrel Proteins
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 エドワード ジャーマニー
2. 発表標題 Conserved internal -signals regulate OMP assembly in gram-negative bacteria.
3. 学会等名 遺伝研研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------