

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657073

研究課題名(和文) 葉緑体包膜のメガダルトン級蛋白質輸送装置の立体構造解明への挑戦

研究課題名(英文) Purification of mega-complexes involved in preprotein translocation across the chloroplast envelope membranes

研究代表者

中井 正人 (Nakai, Masato)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：90222158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質の細胞内輸送と膜透過は細胞構築原理の根幹に関わる重要な問題である。生命は進化の過程で、ごく少数の蛋白質膜透過装置トランスロコンを生み出してきた。原核生物型SECトランスロコンに関しては構造レベルの解析まで進んでいるが、真核生物型に関しては、構造レベルの解析まで進んだ例はほとんどない。われわれは、高等植物葉緑体の特に内包膜に存在する1メガダルトンものTICトランスロコン、TICと連携し輸送モーターとして機能すると考えられる2メガダルトン複合体の完全同定にも成功している。本研究では、タバコ形質転換体を用いる事で両複合体を単独および超複合体として高度に精製する条件を確立する事ができた。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of molecular mechanism of protein translocation across cell membranes is fundamentally important for cell biology. Several different type of protein translocation machineries called translocons have been so far identified and characterized. Among them, only bacterial-type SEC translocons have been extensively studied from the structural aspects simply because of some difficulty to obtain high amount of purified translocons of eukaryotic-type. In this study, we have successfully purified TIC translocon at the inner envelope membrane of chloroplast as well as its associated import motor complex.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：蛋白質膜透過 細胞内蛋白質輸送 オルガネラ 葉緑体 膜蛋白質複合体

1. 研究開始当初の背景

(1) 葉緑体は光合成だけでなく、窒素同化や硫黄同化などさまざまな重要な代謝機能を担っている。これらの複雑な代謝活動は、葉緑体を構成する2千種類を超える蛋白質が適材適所適時に葉緑体に輸送されることで維持されている。この輸送過程は、細胞質ゾルで合成された葉緑体前駆体蛋白質の輸送シグナルが書き込まれたトランジット配列を、葉緑体外包膜の蛋白質輸送装置 TOC が認識する事で始まる。前駆体蛋白質は TOC のチャンネル部分を介して外包膜を通過した後、内包膜の TIC 輸送装置に認識され、TIC のチャンネル部分を介して内包膜を透過してストロマへと運ばれる。

(2) これら一連の過程の主役となるのは TOC および TIC 輸送装置であるが、前者について、我々は、2006年に Toc159/75/34 と呼ばれるコンポーネントが安定な1メガダルトンに近い大きさの巨大な膜蛋白質超分子複合体を形成している事を示している。一方、後者の TIC 複合体に関しては、2009年に、この複合体が Tic20 という蛋白質を中心に、1メガダルトン程度の膜蛋白質超分子複合体を形成していることを示した。さらにこの TIC 複合体に関しては、最近我々の研究に大きな進展があり、Tic20 の他に全く新奇な TIC 因子を3種類含んでいることが明らかになり、その完全同定にも成功している

2. 研究の目的

(1) TOC の構成因子である Toc159/75/34 に関しては、我々のグループを含む世界中のいくつかの研究グループにより、また Tic20 を含む1メガダルトン TIC 複合体の新奇構成蛋白質に関しては、我々のグループにより、その機能に関する生化学的および遺伝学的解析が進められている。これらの巨大な超分子膜蛋白質複合体の機能を完全に理解するには、その構造情報は不可欠であるが、TOC 複合体に関しては数年前に部分分解物の低解像度の電顕像が、TIC 複合体に関しては、最近我々のグループによるやはり低解像度の電顕像が得られているだけであり、ここの因子のアミノ酸側鎖レベルでの機能の立体構造レベルでの理解にはほど遠い状況にある。

(2) このような背景にあり、今回、大量に入手可能な市販の植物をスタート材料とすることで、高解像度の電顕3D画像の取得やX線結晶構造解析をも視野に入れた、TOC および TIC 複合体の大量精製と構造解析試料の大量調製を試みる本研究の着想に至った。

3. 研究の方法

(1) これまで取られてきた手法では、

TOC や TIC 複合体を例えばX線結晶構造解析に使える結晶を調製する結晶化条件のスクリーニングに十分な量、単離する事は不可能である。そこで、数十キログラムあるいは数百キログラムの単位で入手が可能な市販のハウレンソウを材料に、大腸菌にて発現精製が容易な前駆体蛋白質と、それを結合しうる安価に調製できる2段階のアフィニティ樹脂を用いて、TOC および TIC 複合体の同時大量精製を目指す。

(2) 大量精製が可能となれば、ネガティブ染色電顕解析およびクライオ電顕解析による一分子解析により、高解像度の3Dイメージの取得を目指す。この際、TOC と TIC 複合体が物理的に接触している(連続して機能している)可能性も考慮に入れ解析を進める。さらに、さまざまな結晶化条件のスクリーニングを行い、結晶が得られれば、X線回折画像を取得し、将来のX線構造解析へと研究を発展させる足がかりとする。

4. 研究成果

(1) 本研究で計画した、膜透過中間体を利用して、葉緑体外包膜と内包膜の輸送装置 TOC および TIC を精製するために、まず、様々な前駆体蛋白質を計画した。実験に用いたのは、Rubisco small subunit, Ferredoxin, Ribosomal protein L11, LHCP のそれぞれの前駆体蛋白質である。これらを、精製用のタグのみを付加したもの、あるいは、分子を長くするために、いくつかの蛋白質との融合蛋白質として、したがってそこにさらに精製用のタグを付加したものを計画した。これらを大腸菌にて大量に発現させ、変性条件下で高精度に精製する事ができた。

(2) 次に精製蛋白質を用いて、市販のハウレンソウから単離した葉緑体を用いて、in vitro の輸送実験を行い、これらが正常に葉緑体内に取り込まれるかどうか確認した。また ATP 濃度を制限する事で、膜透過中間体が蓄積してくるかどうか解析した。その結果、いずれも、葉緑体内のストロマまで輸送される事が確認されたが、その輸送効率には大きな差があった。それは、必ずしも前駆体の長さとは直接関係していないという事も分かった。

(3) そこで、有意に輸送中間体が蓄積している前駆体、および輸送条件のもと、大量に in vitro の膜透過実験を行い中間体を多量に蓄積させ、そこから、前駆体に導入してあるタグを用いて、大量精製を試みた。その結果、基本的に、いずれの前駆体を用いても、TOC-TIC 複合体が精製されてくるものの、その精製効率には大きな差が認められた。しかし、一番多量に蓄積してくるものを用いても、その精製効率は高くなく、膜透過中間体を用

いた精製方法で構造解析などの物理化学的手法に持ち込むには、さらに収量をかなり高める必要があると思われた。

(4) 精製効率が高くない理由は、膜透過中間体では、精製用のタグの露出度が不十分なのか、その構造に変化が及んでいるのか、精製に用いているアフィニティレジンに対して、充分量の間体が回収されていない事も分かった。この点については、タグを変化させる、あるいは前駆体のデザインを変えるなどの更なる工夫が必要である事が分かった。特に、前駆体と、膜透過装置との相互作用は一過的であり、決して強くない事を考慮に入れる必要がある。膜透過中間体といっても、さまざまな膜透過段階のミクスチャーとなった場合、計画している以後の構造解析においても、構造決定が困難となる可能性もある。膜透過段階を安定化する方法、かつ、膜透過がある特定のところで均一に停止する方法、そのような工夫を施す必要がある。

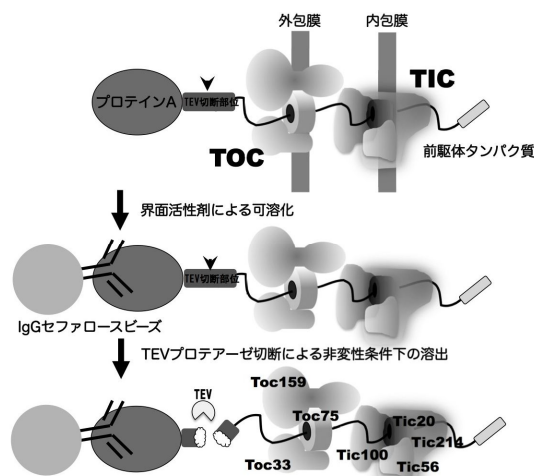


図2 単離葉緑体で蓄積させた膜透過中間体を利用したTOCおよびTIC複合体の精製

単離葉緑体に前駆体タンパク質を輸送させ、膜透過中間体を蓄積させる。可溶化してIgGセファロースに吸着させた後、融合タンパク質に組み込んであるTEVプロテアーゼ認識部位で切断する事により、前駆体に結合しているTOCおよびTIC複合体を非変性条件で特異的に溶出することができる。

5. 主な発表論文等

(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 2件)

菊地 真吾、平野 美奈子、井出 徹、中井 正人、明らかにした葉緑体のトランスロコン、細胞工学、査読無、32(8)巻、2013、pp. 882-883.

Shingo Kikuchi, Jocelyn Bédard, Minako Hirano, Yoshino Hirabayashi, Maya Oishi, Midori Imai, Mai Takase, Toru Ide, Masato

Nakai、Uncovering the Protein Translocon at the Chloroplast Inner Envelope Membrane、Science、査読有、339(6119)、2013、pp. 571-574.

[学会発表](計 11件)

Masato Nakai、Reevaluation of the involvement of the "old" Tic proteins in chloroplast protein import、The 16th Annual Meeting of The French Society of Photosynthesis、2014年 4月14日 France、Paris

Masato Nakai、The evolution of the chloroplast protein import system、A DYNAMO LABEX SYMPOSIUM "Evolution, biogenesis and dynamics of energy transducing membranes"、2014年 4月10日 France、Paris

Masato Nakai、R Unraveling the mechanism of protein transport across the chloroplast inner envelope membrane、East Asian Cell Biology Conference "focusing on the protein trafficking and protein targeting to various organelles"、2014年 4月3日 韓国、浦項 POSTECH

中井 正人、葉緑体タンパク質輸送装置の確立・進化、第36回 日本分子生物学会年会 ワークショップ"寄生・共生におけるゾンビ化機構の分子生物学的解析"、2013年 12月5日 神戸 国際会議場
中井 正人、葉緑体タンパク質輸送と光合成超分子複合体の形成、第77回日本植物学会年会 シンポジウム"光合成の超分子複合体の構造と動態"、2013年 9月14日 札幌 北海道大学高等教育推進機構

Masato Nakai、New evolutionary insights into the chloroplast protein import system、The 12th International Forum on Infection and Immunity、2013年 9月13日 淡路島 夢舞台国際会議場

Masato Nakai、A novel TIC translocon-associated import motor?、EMBO Conference "From Structure to Function of Translocation Machines"、2013年 4月16日 クロアチア Dubrovnik

中井 正人、葉緑体内包膜の新奇な蛋白質輸送装置：葉緑体進化の新たな謎、第15回 植物オルガネラワークショップ"第54回 日本植物生理学会 関連集会：オルガネラの進化とダイナミズム"、2013年 3月20日 岡山 オルガホール
中井 正人、一次共生進化の初期過程でのタンパク質輸送装置の確立・進化、第76回 日本植物学会年会 シンポジウム"マトリョーシカ型進化と植物：その多様性から分子基盤まで"、2012年 9月15日 姫路 兵庫県立大学

Masato Nakai, Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope, Gordon Research Conference "Mitochondria & Chloroplasts", 2012年 8月 2日 アメリカ Smithfield

Masato Nakai, Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope, 第 12 回日本蛋白質科学会年会シンポジウム"細胞内のタンパク質動態と細胞機能", 2012年 6月 20日 名古屋国際会議場

6 . 研究組織

(1)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：9 0 2 2 2 1 5 8