

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450132

研究課題名(和文) 葉緑体蛋白質輸送における膜透過中間体の解析

研究課題名(英文) Analyses of Protein Translocation Intermediates Formed during Protein Import into Chloroplasts

研究代表者

秋田 充 (AKITA, Mitsuru)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号：50335890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：核内ゲノムにコードされた葉緑体蛋白質の前駆体は、二重の包膜に存在する独自の蛋白質輸送装置(トランスロコン)を利用して、サイトゾルより輸送される。多くの知見は、包膜透過に必要なエネルギーを制限することで形成される、前駆体輸送がトランスロコン中で停止した初期膜透過中間体の解析により得られてきた。しかし、初期段階における各因子のかかわりや、初期段階以降の前駆体蛋白質、トランスロコン因子の分子機構については未解明である。本研究では、蛋白質輸送における前駆体蛋白質とトランスロコン因子間、またはトランスロコン因子同士の分子間相互作用を解析するための基盤を整備した。

研究成果の概要(英文)：Nuclear-encoded chloroplastic proteins are imported into chloroplasts by utilizing the unique translocation machinery (translocon) embedded in the double-envelope membranes from the cytosol after translated as precursors. Most of knowledge regarding protein import have been gained through the analyses of the early-translocation intermediates formed under limited energy conditions, in which precursors are trapped in the translocon. However, many questions regarding molecular actions taking place in the early stage of protein import have not been fully understood. In addition, so far as the latter stages of protein translocation are concerned, almost nothing have been solved yet. During the research period, I have designed and prepared the tools to analyze the protein-protein interactions between precursors and the translocon component(s) and intra-interactions within the translocon at not only the early stage, but also the latter stages of protein import into chloroplasts.

研究分野：農学

キーワード：葉緑体 蛋白質輸送 前駆体蛋白質 蛋白質輸送装置

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 葉緑体への蛋白質輸送研究の重要性

葉緑体蛋白質の大部分は、核内ゲノムにコードされており、サイトゾルで葉緑体移行シグナル(トランジット配列)をN末端に持つ前駆体として合成された後、葉緑体を囲む二重の包膜に存在する蛋白質輸送装置(トランスロコン) Toc 及び Tic 複合体を利用して葉緑体内部に輸送される。葉緑体とミトコンドリアは、ともに共生を源にすると考えられており、両者とも二重の生体膜に囲まれているが、両オルガネラへの蛋白質輸送は同一でない。葉緑体とミトコンドリアへの蛋白質輸送は、異なるエネルギー要求性(葉緑体: ATP、GTP; ミトコンドリア: ATP、膜電位)を示し、全く異なる因子が関与する。したがって、独自の輸送システムを有する葉緑体への蛋白質輸送機構の解明は、重要な研究課題である。

現在、葉緑体への蛋白質輸送研究では、同定された因子の機能の生化学的、遺伝学的解析が行われている。しかし、前駆体蛋白質の葉緑体表層での認識から膜透過の開始に至る過程、ATP の加水分解エネルギーを利用して前駆体蛋白質を葉緑体の内部に引き込む過程といった、蛋白質輸送の重要ステップにおける分子機構に関する知見は乏しい。また、未同定の因子の存在も考えられるが、全体像の把握には至っていない。

### (2) これまでの内外における動向

葉緑体の蛋白質輸送では、エネルギー条件を制限する(GTP/ATP の濃度や温度)ことにより、前駆体蛋白質と葉緑体とが不可逆的に結合(ドッキング)し、前駆体蛋白質の膜透過が途中で停止した初期膜透過中間体を形成する。そのため、初期膜透過中間体を解析することで、トランスロコン因子の発見と同定等、蛋白質輸送に関連する重要な知見がこれまで多数得られてきた。

### (3) これまでの研究成果

私は、ドッキング状態における前駆体蛋白質を取り巻く環境に着目することで、エネルギー条件の違いから、前駆体蛋白質の到達度の異なる3種の初期膜透過中間体が形成されることを明らかにした(文献)。また、システイン残基を様々な位置に一つだけ持つように改変した前駆体蛋白質を用いてシステインスキニング法を適用することで、ドッキング状態において部位特異的架橋実験を行った。初期膜透過中間体、架橋剤の導入部位に応じて、異なる架橋産物が観察され、そのう

ちの一つは、前駆体蛋白質と外包膜チャンネル蛋白質 Toc75 との架橋産物であった(文献)。これらの実験結果に基づき、蛋白質輸送の重要ステップである、前駆体蛋白質の生体膜表層での認識から膜透過の開始に至る過程を、空間軸と時間軸の異なる3種の間mediateとして単離することが可能となった。

一連の研究を行うにあたり、大腸菌で過剰発現したエピトープタグを連結したリコンビナント蛋白質を前駆体蛋白質として用いた。封入体として回収されるリコンビナント蛋白質を尿素で可溶化し、エピトープタグを抗体で検出することで、リコンビナント前駆体蛋白質を用いる *in vitro* 蛋白質輸送実験系を開発した(文献)。葉緑体は、1個あたり2-3,000ヶ所の蛋白質輸送サイトを有すると考えられている。本実験系の開発により、ドッキング条件下で蛋白質輸送サイトを前駆体蛋白質で飽和させることが可能となった。

## 2. 研究の目的

蛋白質膜透過において、蛋白質が生体膜の表層で認識されてから、膜透過を完了するまでには、輸送基質である前駆体蛋白質とトランスロコンを構成する因子との間で逐次的な相互作用が不可欠である。これまでは、初期膜透過中間体の解析をとおして、蛋白質輸送に関与する因子が同定されてきたが、上で述べたこれまでの成果から、異なる初期膜透過中間体の存在が明らかとなったことから、異なる初期膜透過中間体を構成する因子にも相違がある可能性がある。一方、前駆体蛋白質が初期膜透過中間体から解離し、輸送が完了するまでの過程を留めることができないので、蛋白質の膜透過とともに、トランスロコンも動的に変化している可能性も高く、初期膜透過中間体中には存在しない未同定因子の関与も疑われても、現時点では解決する手段が皆無であるため、膜透過進行中における分子機構は未解明である。したがって、本研究は、それぞれの初期膜透過中間体における、前駆体蛋白質とトランスロコン因子との間、あるいは、トランスロコン因子同士の間の分子間相互作用を解析する。また、蛋白質の膜透過が停止した膜透過中間体(後期膜透過中間体)を獲得するために、C末端部に立体障害を導入する前駆体蛋白質の開発を行う。これらの研究を通して、前駆体蛋白質の葉緑体表層での認識から膜透過の完了に至る葉緑体への蛋白質輸送の全体の流れを分子間相互作用の観点から明らかにする。

### 3. 研究の方法

上記目的を達成するためには、実験に供する前駆体蛋白質に工夫を施す必要があった。そこで、システイン残基を全てセリン残基に置換した変異型 Rubisco 小サブユニット前駆体蛋白質(prSSC0)をベースに、種々のタグや、他の蛋白質を連結、挿入、置換することにより改変した前駆体蛋白質をコードする遺伝子を大腸菌発現ベクターに組み込んだ。大腸菌での過剰発現の後、これらの前駆体蛋白質の有用性について調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) BAP 連結前駆体蛋白質

C 末端にヘキサヒスチジンタグ(His タグ)を連結した前駆体蛋白質を用いて形成させた初期膜透過中間体の His タグを利用した精製には難があることが以前判明していたので、初期膜透過中間体の精製には、ビオチン化した前駆体蛋白質を用いることで、ストレプトアビジンによる、より特異的な精製を試みることとした。従来は、前駆体蛋白質に導入したシステイン残基を修飾するビオチン化試薬により、前駆体蛋白質をビオチン化していた(文献 )が、将来的な研究の発展における、未修飾システイン残基の重要性を考慮して、全システイン残基をセリン残基に置換した変異型前駆体蛋白質(Rubisco 小サブユニット前駆体蛋白質)(prSSC0)の C 末端にビオチン化タグである BAP (Biotin Acceptor Peptide) を連結した蛋白質の遺伝子を大腸菌発現ベクターにクローニングし、過剰発現を確認した。過剰発現の際、前駆体蛋白質の約 70%のビオチン化に成功した。

過剰発現後、大腸菌を破碎し、得られた沈殿画分を 8 M 尿素溶液で可溶化した。Streptavidin-agarose を用いて前駆体蛋白質を精製したところ、非ビオチン化前駆体蛋白質と分離することができ、ほぼ均一の前駆体蛋白質を獲得することができたことから、本前駆体蛋白質は、膜透過中間体の精製に対して有効である可能性が示唆された。

#### (2) 立体障害を導入した前駆体蛋白質の獲得 - 一価性ストレプトアビジンの利用

後期膜透過中間体を形成させるための道具として、前項の精製ビオチン化前駆体蛋白質に、ストレプトアビジンを結合させることで立体障害を導入した前駆体蛋白質の単離を試みた。野生型のストレプトアビジン(SA)は、4 量体であり、4 か所にビオチンが結合する。

そこで、1 個のサブユニットだけビオチンとの親和性を維持しながら、野生型 SA とビオチンに対する親和性遜色のない、一価性ストレプトアビジン(A1D3)(文献 )を用いることとした。既に報告のあるアミノ酸配列情報(文献 )に基づいて人工合成したビオチンの親和性を失ったサブユニット(D: Dead)と維持しているサブユニット(A: Alive)をコードする遺伝子をそれぞれ大腸菌発現ベクターに組み込むことでプラスミドを作製した。別々に大腸菌内で過剰発現した後、尿素で可溶化し、A に対して D が過剰に存在する条件で、一気に緩衝液に希釈することで A1D3 を再構成した。

再構成した A1D3 を前述の BAP 連結前駆体蛋白質に結合させた後、エンドウ芽生えより単離した葉緑体を用いた *in vitro* 蛋白質輸送実験に供した。前駆体蛋白質は、非共有結合ながら A1D3 と強固に結合していたにもかかわらず、ポリアクリルアミドゲル上で、A1D4 を結合していない前駆体蛋白質を用いた対象実験と同じサイズにプロセスされ、低分子量側にシフトしたバンドが観察された。このことから、葉緑体表層において、ビオチン - ストレプトアビジン間の分子間相互作用を破壊するほど強い変成作用を呈する何らかの因子が存在することが示唆された。

ストレプトアビジンにはビオチンとの相互作用をより安定にする変異が報告されている(文献 )ので、同様の変異を導入してから、上記と同様に A1D3 を再構成の上、BAP 連結前駆体蛋白質に結合させたところ、変異を導入する前と比較して、A1D3 と前駆体蛋白質との相互作用に対する温度の安定性は増大した。そこで、と同様、この安定化変異 A1D3 を用いた *in vitro* 蛋白質輸送実験を実施したところ、と同一の結果が得られた。との結果から、葉緑体表層において、ビオチン - ストレプトアビジン間の分子間相互作用を破壊するほど強い変成作用を呈する何らかの因子が存在することが示唆された。

現在、BAP と A1D3 間を分子間力による結合のみならず、架橋剤によって共有結合させることで A1D3 を固定した前駆体蛋白質の作製中であり、今後、固定化による立体障害の影響を調べる予定である。

#### (3) 立体障害を導入した前駆体蛋白質の獲得 - 安定にフォールドする蛋白質の連結

前項では、前駆体蛋白質への立体障害の導入に、分子間相互作用因子を用いた。一方で、前駆体蛋白質に安定にフォールドする蛋白質を連結することで、同一分子内で立体障害を

導入することのできる前駆体蛋白質の獲得を試みた。これまで、大腸菌で過剰発現した前駆体蛋白質はいずれも不溶性画分に回収され、輸送実験の際には、変性剤である尿素で可溶化する必要があった(文献 )が、一部フォールドした蛋白質を用いるためには、前駆体蛋白質は、可溶性の状態での獲得が必要であった。フォールドする蛋白質として、葉酸のアナログであるメトトレキサートの存在下で3次構造が安定化するジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を用いることとした。以前の研究から、可溶化度の高いGFPにprSSC0の葉緑体移行シグナル(TP(prSS))を連結しても過剰発現した当該蛋白質は、不溶性になったことから、当初、TP(prSS)に前駆体蛋白質の長さを調節するためにランダムコイル構造(r)をとるペプチドGGGGSの繰り返し配列を介してDHFRを連結したキメラ前駆体蛋白質(TP-r-DHFR)のN末端側に、大腸菌での過剰発現の際、可溶性度を促進する蛋白質性のタグSmt3(文献 )と、輸送実験の際にSmt3を切除するためにTEVプロテアーゼ認識部位(Smt3-TEV)を連結した。さらに、C末端側には精製のための道具としてHisタグのかわりにHAT(Histidine Affinity Tag)とBAPを連結した前駆体蛋白質(Smt3-TEV-TP-r-DHFR-HAT-B)を設計し、当該前駆体蛋白質をコードする遺伝子を大腸菌発現ベクターに組み込んだプラスミドを作製した。大腸菌で過剰発現したところ、Smt3-TEV-TP-r-DHFR-HAT-Bは可溶性画分に回収された。

Smt3-TEV-TP-r-DHFR-HAT-Bの分子量マーカーとして上述の大腸菌発現プラスミドより、Smt3-TEV遺伝子を取り除いたプラスミドを用いた過剰発現の結果、TP-r-DHFR-HAT-BはSmt3-TEVがなくても可溶性画分に回収された。

TP-r-DHFR-HAT-Bが可溶性画分に回収されたことで、HATを指標にTP-r-DHFR-HAT-Bを精製し、精製前駆体蛋白質を*in vitro*蛋白質輸送実験に供した。予めメトトレキサートでDHFRのフォールディングを強化したところ、TP-r-DHFR-HAT-Bのプロセシング効率が低下した。さらに、輸送実験後の葉緑体を可溶性画分と膜画分に分離したところ、メトトレキサート処理をした場合、プロセスしたTP-r-DHFR-HAT-Bは、全て膜画分に回収された。このことはDHFRによる立体障害の結果、前駆体蛋白質が蛋白質輸送チャネルをふさぐことで、後期膜透過中間体が形成された一方で、前駆体蛋白質の先端部は、すでにストロマ空間内に達しており、ストロマプロセシングペプチダーゼによりTPが切断された可能性を示唆している。

後期膜透過中間体の形成の可能性が示唆されたことから、ランダムコイルリンカー(r)の長さを調節したTP-r-DHFR-HAT-Bのプロセス産物の葉緑体内局在を確認することで、膜画分に回収されたプロセスされたTP-r-DHFR-HAT-Bと後期膜透過中間体との関連を考察する。後期膜透過中間体の可能性が高まれば、BAPに共有結合したビオチンを指標に中間体の精製に取り掛かる。

#### <引用文献>

Inoue, H., and Akita, M. Three sets of translocation intermediates are formed during the early stage of protein import into chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, **283**(12): 7491-7502 (2008)

Akita, M., and Inoue, H. Evaluating the energy-dependent "binding" in the early stage of protein import into chloroplasts. In Michael L. Johnson, M. L., Holt, J. M., and Ackers, G. K. (eds) *Methods in Enzymology*, Vol. 466 Biothermodynamics Part B, Burlington: Academic Press, pp. 43-64 (2009)

Inoue, H., and Akita, M. The transition of early translocation intermediates in chloroplasts is accompanied by the movement of the targeting signal on the precursor protein. *Arc. Biochem. Biophys.*, **477**(2): 232-238 (2008)

Inoue, H., Ratnayake, RMU., Nonami, H., and Akita, M. Development and optimization of an *in vitro* chloroplastic protein import assay using recombinant proteins. *Plant Physiol. Biochem.*, **46**(5-6): 541-549 (2008)

Howarth, M., Chinnapen, DJ., Gerrow, K., Dorrestein, PC., Grandy, MR., Kelleher, NL., El-Husseini, A., Ting, AY. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat. Methods*, **3**(4): 267-273 (2006)

Chivers, CE., Crozat, E., Chu, C., Moy, VT., Sherratt, DJ., Howarth, M. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nat. Methods*, **7**(5): 391-393 (2006)

Reznik, GO., Vajda, S., Smith, CL., Cantor, CR., Sano, T. Streptavidins with intersubunit crosslinks have enhanced stability. *Nat. Biotechnol.*, **14**(8): 1107-1111 (1996)

Marblestone, JG., Edavettal, SC., Lim,

Y., Lim, P., Zuo, X., Butt, TR.  
Comparison of SUMO fusion technology  
with traditional gene fusion systems:  
enhanced expression and solubility  
with SUMO. *Protein Sci.*, **15**(1): 182-189  
(2006)

## 5. 主な発表論文等

### 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)

[学会発表](計 8件)

Manoj Pohare, 秋田充. 一価性ストレプト  
アビジン 4 量体を付加した前駆体蛋白質を  
用いた葉緑体への蛋白質輸送実験. 日本農  
芸化学会 2015 年度中四国・西日本支部合  
同大会, 愛媛大学樽味キャンパス(愛媛県  
松山市), 9月18日, (2015)

秋田充, 大島侑乃, 石川貴美子, Manoj  
Pohare. フォールドしたポリペプチドを成  
熟部位有する人工前駆体蛋白質を用いた  
葉緑体への蛋白質輸送実験. 日本農芸化学  
会 2015 年度中四国・西日本支部合同大会,  
愛媛大学樽味キャンパス(愛媛県松山市),  
9月18日, (2015)

Manoj Pohare, Mitsuru Akita. Isolation  
of the translocation intermediates  
formed during protein translocation  
into chloroplasts (II) Precursor  
proteins with steric hindrance to block  
protein translocation. 日本農芸化学会  
2015 年度大会, 岡山大学津島キャンパス  
(岡山県岡山市), 3月28日, (2015)

秋田充, Manoj Pohare, 三好貴子. 葉緑体  
への蛋白質輸送における膜透過中間体の  
単離(Ⅰ) 可溶性組換え前駆体蛋白質の  
作製. 日本農芸化学会 2015 年度大会, 岡  
山大学津島キャンパス(岡山県岡山市), 3  
月28日, (2015)

Mitsuru Akita. Transport through  
Envelope Membranes of Plastids. 公開国  
際シンポジウム「ファイトゾーンの可能  
性と未来 VII」, かがわ国際会議場(香川県  
高松市), 9月30日, (2014)

秋田充, Manoj Pohare, 三好貴子. 立体障  
害を導入した前駆体蛋白質を用いた葉緑  
体への蛋白質輸送. 日本農芸化学会 2014  
年度中四国支部大会. 徳島大学常三島キャン  
パス(徳島県徳島市), 9月27日, (2014)

秋田充, Manoj Pohare, 山本祐希, 米永貴  
洋, 今井綾奈. 葉緑体蛋白質輸送における  
膜透過中間体の形成. 日本農芸化学会 2014

年度大会, 明治大学生田キャンパス(神奈  
川県川崎市), 3月28日, (2014)

山本祐希, 今井綾奈, 秋田充. DHFR 融合  
蛋白質を用いた *in vitro* 葉緑体蛋白質輸  
送実験. 日本農芸化学会中四国支部第 38  
回講演会(例会), 香川大学農学部(香川  
県木田郡三木町), 1月25日, (2014)

## 6. 研究組織

(1) 秋田 充 (AKITA, Mitsuru)

愛媛大学・農学部・准教授

研究者番号: 50335890