

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291060

研究課題名(和文)植物葉緑体内包膜における蛋白質輸送メカニズムの完全解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms of chloroplast protein import

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) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物の葉緑体は様々な組織および器官で機能的・形態的に多様に分化して存在しており、その機能は環境変化による複雑な制御を受けている。多様な葉緑体の機能の維持には、各葉緑体の機能に適した蛋白質セットが、適材適所適時に輸送され機能しているからに他ならない。この葉緑体への蛋白質輸送の中核を成す内包膜のトランスロコンTIC複合体に関して、我々はシロイヌナズナから1メガダルトンの超分子複合体として精製し完全同定に成功した。さらに最近TIC複合体と連携し輸送モーターとして機能すると予想される新奇7因子からなる2メガダルトンの膜複合体も完全同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Virtually all chloroplasts/plastids in today's photosynthetic/plastid-containing eukaryotes derive from one successful primary endosymbiotic event with a cyanobacterium-like ancestor. During evolution, massive transfer of genes from the endosymbiont to the host's nuclear genome occurred concomitant with establishment of a protein transport system that allows these nucleus-encoded proteins back into the endosymbiotic organelle. Two successive protein translocons at the outer and inner envelope membranes of chloroplast, termed TOC and TIC, respectively, are responsible for this protein transport. We previously identified a novel inner envelope membrane protein complex consisting of Tic20, Tic56, Tic100, and Tic214 (Ycf1) in Arabidopsis. Furthermore, we have recently identified a completely novel ATPase complex at the inner envelope which functions as the TIC(20/56/100/214)-associated ATP-driven import motor for preprotein translocation.

研究分野：Plant Molecular Cell Biology

キーワード：chloroplast protein import protein translocation translocon organelle biogenesis

## 1. 研究開始当初の背景

葉緑体に代表される植物や藻類に特異的なオルガネラであるプラスチドは、光合成だけでなく、窒素同化や硫黄同化、アミノ酸および脂質の生合成等をおこなう、必須のオルガネラである。多様なプラスチドの機能が維持できるのは、それぞれのプラスチドの機能に適した蛋白質セット(適材)が、適時に発現し、適所に配置され、さらにそこでさまざまな制御を受けて機能しているからに他ならない。現在の高等植物においては、葉緑体ゲノムには100種類程度の蛋白質がコードされているにすぎず、およそ3000種類を超える多様な蛋白質が核ゲノムにコードされており、これらの蛋白質をプラスチドへ輸送し配置する複雑な分子装置が存在することが、これまでの解析で明らかにされつつある。

プラスチド外包膜には様々なプラスチド蛋白質を認識する TOC レセプターが複数種存在し、光合成に關与する蛋白質とハウスキープ的に働く蛋白質とを異なる親和性で認識することで、それぞれの輸送効率を維持しつつ独立して機能することが可能となっている。このような輸送効率の制御には、内包膜に存在する TIC 輸送装置も關与している可能性がある。この内包膜の蛋白質輸送装置-プロテントランスロコンの実体については、近年まで不確かであり、従ってその制御のメカニズムも全く未解決の問題として残されていた。

我々は、輸送中間体の詳細な解析から、内包膜におよそ1メガダルトンの新奇な輸送装置複合体が存在し、Tic20 が中心的構成因子として含まれていることをこれまでの研究により明らかにしていた。さらに、Tic20 に精製用のアフィニティタグを付加した形質転換シロイヌナズナ植物体を用いることで、この超分子膜蛋白質複合体をその1メガダルトンのサイズのまま高度に精製する事に成功した。精製した TIC 複合体は、Tic20 を含む生育に必須な4因子から形成されていた。新たに見出された3因子は全く新奇な蛋白質であり、葉緑体ゲノムコードの蛋白質も含まれていた (Science 誌掲載済)

## 2. 研究の目的

プラスチド蛋白質の外包膜内包膜の通過には、ATP 加水分解から得られるエネルギーが必要であることがわかっている。この ATPase (インポートモーターと呼ぶ) の実体についても長く不明であった。そこで、本研究では、われわれが見出した TIC 複合体と協調的に働くインポートモーターの実体を特定し、その全構成因子の決定とキャラクター化を進める。

## 3. 研究の方法

われわれはこれまでに、単離葉緑体と精製葉緑体前駆体蛋白質を用いた *in vitro* 蛋白質輸送実験系を用い、輸送中間体を蓄積させ、これを輸送装置ごと高度に精製することに成功している。この手法を用いて、TOC および TIC に引き続きストロマ側で相互作用するモーター蛋白質複合体の候補を選び出し、さらに、その候補に精製用のタグを付加した形質転換植物を利用して、このモーター複合体の精製と全構成因子の完全同定を目指す。同定できれば、シロイヌナズナで利用可能な変異体を多数取得し、個々の構成因子が、葉緑体蛋白質輸送過程において必須の役割を担っているのかどうか、解析する。

さらに、シロイヌナズナの TIC 複合体および新たに見出した2メガダルトンの ATPase 膜蛋白質複合体の各構成因子に関して、機能的に重要な領域はどこか、すなわち、

- a) 因子間および複合体間の相互作用領域はどこか、
- b) 輸送される様々な前駆体蛋白質の認識および相互作用領域はどこか、
- c) 様々な環境変化で制御を受ける領域はどこか、
- d) 外包膜の TOC 複合体やストロマ側の分子シャペロン因子との相互作用領域はどこか、

等について、生化学的、植物生理学的、分子生物学的、手法を駆使して迫る。

## 4. 研究成果

TIC 複合体を通過後に前駆体蛋白質が相互作用する2メガダルトンもの新規な巨大膜蛋白質複合体の単離および、その構成因子の完全同定に成功した。この複合体は新規 ATPase を含む7因子から成り、そのすべての構成因子がいずれもシロイヌナズナの生育に必須であった。葉緑体内包膜の蛋白質膜透過には ATP の加水分解エネルギーが必要であり、今回見出した複合体こそが ATP 加水分解を伴って膜透過を駆動する輸送モーター複合体であると結論づけた。

さらに本研究を進展させて、基質である前駆体蛋白質との相互作用領域の特定、外包膜 TOC 複合体との機能的および物理的相互作用の解析、ストロマの分子シャペロン因子群との機能的連関の解析を進め、それぞれ相互作用に直接關与すると思われる因子や作用領域に関する情報を得ることに成功した。

## 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3件)

1. Nakai M. New perspectives on chloroplast protein import. 2018; Plant and Cell Physiology, in press.
2. Nakai M. TIC complex uncovered : a translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta. (Bioenergetics), Special Issue on " Chloroplast Biogenesis " . 2015; Sep;1847(9):957-67.
3. Nakai M. YCF1: A Green TIC Plant Cell. 2015; July;27(7):1834-8.

〔学会発表〕(計14件)

1. Nakai M. Molecular mechanisms of chloroplast protein import and their curious evolutionary history. 台湾の植物生物学会と日本の植物生理学会との合同国際学会 Taiwan-Japan Plant Biology 2017, 2017年11月3-6日 Academia Sinica, Taipei City (国際会議・招待講演)
2. Nakai M. Molecular mechanisms of chloroplast protein import and their curious evolutionary history. 国際シンポジウム: KAAB International Symposium 2017, 2017年9月25日 新潟大学・刈羽村先端農業バイオ研究センター, 新潟 (国際会議・招待講演)
3. Nakai M. Molecular mechanisms of chloroplast protein import and their curious evolutionary history. International Symposium: Chloroplast Metabolism and Photosynthesis, 2017年6月26-28日 University of Neuchatel, Switzerland (国際会議・招待講演)
4. Nakai M. 膜結合型 AAA プロテアーゼから変貌を遂げた葉緑体の蛋白質輸送モーター 第39回日本分子生物大会 シンポジウム "ほどく、ひきぬく、あるく: AAA+ ATPaseの作動原理", 2016年12月1日 パシフィコ横浜, 神奈川 (招待講演)
5. Nakai M. The chloroplast protein import system: Evolution and mechanisms. Gordon Research Conference: Mitochondria & Chloroplast 2016年6月19-24日 アメリカ (Mount Snow)(国際会議・招待講演)
6. Nakai M. Chloroplast protein import: Mechanisms and evolution. International Meeting 2016: Nascent Chain Biology 2016年9月2日 山梨(川口湖)(国際会議・招待

講演)

7. Nakai M. Chloroplast Protein Import System BMB2015 日本生化学会・日本分子生物学会 合同大会 シンポジウム "オルガネラバイオロジー: 細胞の構造と機能の新しい姿", 2015年12月2日 ポートピアホテル, 神戸 (招待講演)
8. Nakai M. The evolution of the chloroplast protein import system CIFAR (Canadian Institute for Advanced Research): Integrated Microbial Biodiversity Program Meeting 2015年5月26-29日 カナダ (Victoria)(国際会議・招待講演)
9. Nakai M. The evolution of the chloroplast protein import system Tokyo Tech-HHU Dusseldorf Joint Symposium on Photosynthesis as a New Chemical Resource 2015年3月4日 東工大 (国際会議・招待講演)
10. Nakai M. Unraveling the Mechanism of Protein Transport Across the Chloroplast Inner Envelope Membrane. 日本学術振興会 日本・フィンランド二国間交流セミナー, October 12, 2014, 北海道定山溪. (国際会議・招待講演)
11. Nakai M. Unraveling the Mechanism of Protein Transport Across the Chloroplast Inner Envelope Membrane. The International Symposium on the Regulation of Photosynthetic Function, August 17, 2014, Guilin, China. (国際会議・招待講演)
12. Nakai M. Reevaluation of the involvement of the "old" Tic proteins in chloroplast protein import. The 16th Annual Meeting of the French Society of Photosynthesis, April 14, 2014, Paris, France. (国際会議・招待講演)
13. Nakai M. The Evolution of the Chloroplast Protein Import System. A DYNAMO LABEX Symposium "Evolution, Biogenesis, and Dynamics of Energy Transducing Membranes", April 10, 2014, Paris, France. (国際会議・招待講演)
14. Nakai M. Unraveling the Mechanism of Protein Transport Across the Chloroplast Inner Envelope Membrane. East Asian Cell Biology Conference "The Protein Trafficking and Protein Targeting", April 3, 2014, Pohang, Korea. (国際会議・招待講演)

〔図書〕(計1件)

1. 中井 正人.

葉緑体のタンパク質輸送機構について－シアノバクテリアの内共生から始まったユニークな進化(解説) 生物の科学：遺伝 3月号特集 真核細胞の共生由来オルガネラ研究最前線-広がり続ける多様性と機能(株式会社 NTS) 2016; 70 (2), 105-9.

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

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )