

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05441

研究課題名(和文) 立体障害を導入した前駆体蛋白質を用いて捕捉した葉緑体蛋白質輸送装置の解析

研究課題名(英文) Analysis of Chloroplastic Protein Import Machinery Capturing Precursors Carrying Steric Hindrance

研究代表者

秋田 充 (Akita, Mitsuru)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50335890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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、独自の包膜蛋白質輸送装置(トランスロコン)を利用して、サイトゾルより輸送される。エネルギー制限下で、前駆体はトランスロコン中で停止した初期膜透過中間体が形成され、本中間体の解析を中心に研究が進んできた。しかし、初期段階以降の輸送が完了するまでの蛋白質輸送機構については未解明である。本研究では、蛋白質輸送途上における蛋白質間相互作用の解析を目的として、前駆体をトランスロコンに目詰まりさせることで蛋白質輸送が途中で停止した後期膜透過中間体を獲得するために、立体障害を導入した前駆体蛋白質の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の代謝の中心である葉緑体で代謝に直接関与する一群の蛋白質の大部分は、葉緑体に独自のシステムによりサイトゾルより輸送される。蛋白質輸送機構の解明は、生物学の基本命題である「蛋白質の適材適所」の理解に直結する。また、本研究を通して得られる葉緑体蛋白質輸送に関する知見に基づき、前駆体蛋白質やトランスロコン因子の改良により、蛋白質の輸送効率を改善することであれば、葉緑体の代謝や機能の改変による、収量の向上や物質生産、等バイオテクノロジーでの貢献が期待される。

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-protein translocation intermediates (PTIs) formed under limited energy conditions, in which precursors are trapped in the translocon. However, many questions regarding molecular actions during translocation after release of precursors from the early PTIs have remained unsolved. During the research period, I have designed and prepared precursors carrying steric hindrance which may plug translocon channel to form PTIs under translocation conditions to analyze the protein-protein interactions between precursors and the translocon component(s) and intra-interactions within the translocon.

研究分野：応用生物化学

キーワード：葉緑体 蛋白質輸送 トランスロコン 前駆体蛋白質 膜透過中間体 立体障害

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

蛋白質は、翻訳後、適材適所に配置されることで、生命活動を支える。したがって、生体膜を介した蛋白質の輸送は蛋白質の適材適所にとって極めて重要な過程である。

葉緑体に局在する蛋白質も例外ではない。葉緑体蛋白質の大部分は、核内ゲノムにコードされ、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翻訳される。その後、葉緑体を囲む外・内の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 複合体を利用して能動的に葉緑体内部に輸送される。

葉緑体と同様、共生を源にするミトコンドリアも二重の生体膜に囲まれているが、葉緑体とミトコンドリア、それぞれのオルガネラへの蛋白質輸送では、全く異なるトランスロコン因子が関与し、異なるエネルギー要求性を示す。しかし、現状では、報告済みの各因子の機能解析を含めて、多くの課題が未解明である。したがって、独自の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。

(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、植物体より単離した葉緑体を用いた *in vitro* 蛋白質輸送実験により、GTP/ATP の濃度や温度等、エネルギーを制限すると、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、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。膜透過に十分なエネルギー(室温で mM オーダーの ATP)を供給すると、ドッキング状態にある前駆体蛋白質は初期膜透過中間体からリリースされ、両包膜を透過し、プロセッシングされる。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、以下にも記すように私の業績を含め、これまで多数得られてきた。

(3) これまでの研究成果

私は、これまでに、葉緑体蛋白質輸送研究に関して、以下の業績を上げてきた。

初期膜透過中間体を形成させてから、化学架橋法により架橋複合体として固定した初期膜透過中間体、あるいは、固定しなかった初期膜透過中間体を界面活性剤により可溶化した後、既知トランスロコン因子や、蛋白質輸送への関与が不明であった葉緑体包膜蛋白質や葉緑体分子シャペロンに対する抗体を用いて、免疫沈降実験を行うことで、既知トランスロコン因子とともに、内包膜蛋白質 Tic110 及び AAA+蛋白質である Hsp93 が初期膜透過中間体に含まれることを明らかにした(文献 1-3)。

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 4,5)。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クヤ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 5,6)。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、抗エピトープタグ抗体を用いたイムノプロットングにより、輸送前後の前駆体蛋白質の挙動を検出することで、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構築した(文献 5,7)。葉緑体は、1 個当たり 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、この数に見合う分子数の前駆体蛋白質が輸送サイトに結合した初期膜透過中間体が形成され、プロテオミクス解析に足る量の間mediateの獲得が可能になった。

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。また、前駆体蛋白質が高エネルギー条件下で、初期膜透過中間体から解離し、輸送が完了するまでの膜透過過程においては、蛋白質の移動に伴って、トランスロコン因子はダイナミックに変化することが予想される。したがって、膜透過中の前駆体蛋白質の動きを停止させ、初期段階以降の膜透過中間体（後期膜透過中間体）を形成させることができれば、中間体を単離し、中間体構成因子を解析・同定することで、膜透過の進行にともなう「中間体の変遷」とともに「前駆体蛋白質とトランスロコン因子間、トランスロコン因子同士の連携」が明らかになる。

しかし、チェックポイントであるドッキングのステップを一旦通過すると、膜透過が完了するまでの間の前駆体蛋白質の動きを止めることはできない。これまでに私を含む世界中の研究グループで、非共有結合性の分子間力により安定化した蛋白質を導入した前駆体蛋白質を用いてトランスロコンチャネルをふさぐ試行錯誤がなされてきたが膜透過停止には至っていない（文献 8）。そこで、本研究では、これまでの試みとは異なるコンセプトに基づく立体障害を前駆体蛋白質の C 末端側に導入することで、後期膜透過中間体の獲得を目指す。一連の研究を通して、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

上で記したように、立体障害を有する前駆体蛋白質の作製が本研究の成否を左右する。これまで作製したリコンビナント前駆体蛋白質を用いた実験に基いて、輸送効率の良い Rubisco 小サブユニット前駆体蛋白質のトランジット配列、前駆体蛋白質の検出、精製のためのエピトープタグやヒスチジンタグ、前駆体蛋白質の過剰発現時にビオチン化できるようにビオチン化タグ (BAP) を組込んだ前駆体蛋白質をベースに、下記研究成果に記した種々の要素をさらに組込んだ前駆体蛋白質をコードする遺伝子をクローニングした発現プラスミドを作製した。大腸菌より抽出したリコンビナント前駆体蛋白質と単離葉緑体を用いて、膜透過条件（室温、mM オーダー ATP）で *in vitro* 蛋白質輸送実験を行うことで、後期膜透過中間体の形成の観点から、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

実験環境を含め、様々な要因により、本研究を実施するために満足の行く前駆体蛋白質の作製に想定外の時間がかかってしまったため、以下には、作製した前駆体蛋白質と将来的な利用の展望を記す。

(1) 一価性ストレプトアビジン結合前駆体蛋白質

前駆体蛋白質自身には、立体障害を引き起こす要素は導入していないが、一価性ストレプトアビジンをビオチン化されたリコンビナント前駆体蛋白質に結合させることで、前駆体蛋白質に立体障害を導入した。

Rubisco 小サブユニット前駆体の C 末端に BAP を連結することで、大腸菌での過剰発現の際、前駆体蛋白質の約 70% がビオチン化された。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。ストレプトアビジンアガロース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した。

次に、精製ビオチン化前駆体蛋白質にストレプトアビジン (SA) を結合させた。ストレプトアビジンは、4 量体であり、各サブユニットにビオチン結合部位を有する。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 9) 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 9) 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 A1D3 を結合させたビオチン化前駆体蛋白質を用いて、*in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験を行った。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。

そこで、ビオチンとの相互作用を安定化する安定型一価性 SA (Tr1D3; 文献 10, 11) を利用することとした。上記と同様に Tr1D3 を結合させたビオチン化前駆体蛋白質を獲得し、*in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験を行った。上記と同じ実験結果となったが、輸送速度の減少が観察された (図 1)。ビオチン - SA 間の分子間相互作用を安定化したことで、ビオチン化前駆体蛋白質は A1D3

を用いた場合と同様、葉緑体内に輸送されたものの、輸送速度が減少した。この結果は、膜透過の過程で、非常に強固なビオチン-SA間の分子間相互作用が破壊されたことが示唆している。しかし、本実験では、蛋白質膜透過の際に、Tr1D3が結合したまま、葉緑体内に輸送されたのか、あるいは、ビオチン-SA間の分子間相互作用が膜透過の際に破壊されたのかを判断することを結論付けることができなかった。そこで、SAの検出感度を上げるために、SA単量体(mSA)にエピトプタグを連結したり、SH反応性蛍光分子で修飾するために、mSAのC末端に唯一のシステイン残基を持つ変異体を作製した。今後、これらの変異型SAを用いて、同様の実験を行い、タンパク質膜透過時におけるストレプトアビジンの追跡を行う。

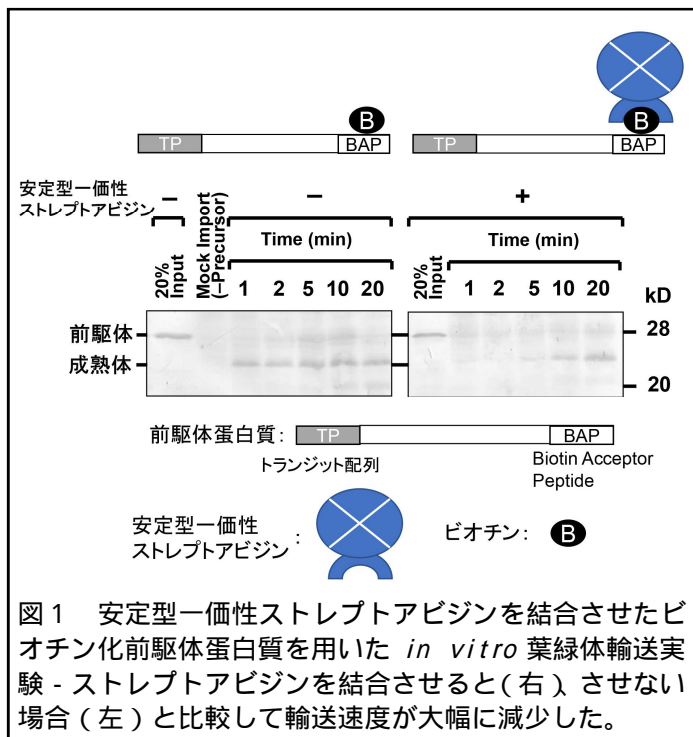


図1 安定型一価性ストレプトアビジンを結合させたビオチン化前駆体蛋白質を用いた *in vitro* 葉緑体輸送実験 - ストレプトアビジンを結合させると(右)、させない場合(左)と比較して輸送速度が大幅に減少した。

(2) 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として各種SAを用いた。しかし、膜透過の過程で、SAがビオチン化前駆体蛋白質から解離した可能性が示唆されたので、SAが安定にフォールドする性質を有することから、SAを前駆体蛋白質に共有結合で連結することで、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。

まず、前駆体蛋白質のC末端側にSAを連結するように、前駆体蛋白質遺伝子の3'側にmSA遺伝子を連結した発現プラスミドを作製し、大腸菌で過剰発現後、前項と同様に、mSAとともにSAの再構成を行った。しかし、SAの再構成の効率は非常に貧弱であった。

そこで、前駆体蛋白質とSAを別々に調製してから、両蛋白質を共有結合で連結することを考えた。前駆体蛋白質とSAを連結するために、相互間で自発的にアミド結合を形成するSpyCatcher (SpyC)とSpyTag (SpyT) (文献12)の利用を検討した。mSA3分子とSpyTを連結したmSA (SpyT-mSA)1分子からTP-SAを再構成し、別途調製したトランジット配列にSpyCを連結した蛋白質 (TP-SpyC)を混合することで前駆体蛋白質のC末端にとストレプトアビジンを共有結合により連結することを試みたが、アミド結合の形成効率は、その後の実験に用いるには十分ではなかった。

最後に、同一大腸菌内においてTP-SpyCとSpyT-mSAの共発現すると、アミド結合によりTP-SpyC=SpyT-mSAが高效率で形成した(図2、(バンド3))。次に、SpyC=SpyT-mSAとmSAにより、SAを再構成すると、前駆体蛋白質とSAを共有結合で連結したTP-SpyC=SpyT-mSA₄が獲得できた(図2、(バンド5))。予備実験では、TP-SpyC=SpyT-mSA₄による蛋白質輸送阻害と葉緑体表層での蓄積が観察された。これらの結果を踏まえ、現在、TP-SpyC=SpyT-mSA₄の精製を行っている。さらに、TPと立体障害までの距離を変えることで、蛋白質輸送時における前駆体蛋白質のN末端の到達度を変えるために、TPとSpyCとの間に様々な長さのリンカーを挿入したTP-SpyCを作製中である。これらの材料がそい次第、輸送実験を行うことで、後期膜透過中間体を獲得し、後期膜透過中間体の解析を行うことで、中間体構成因子の同定を計画している。

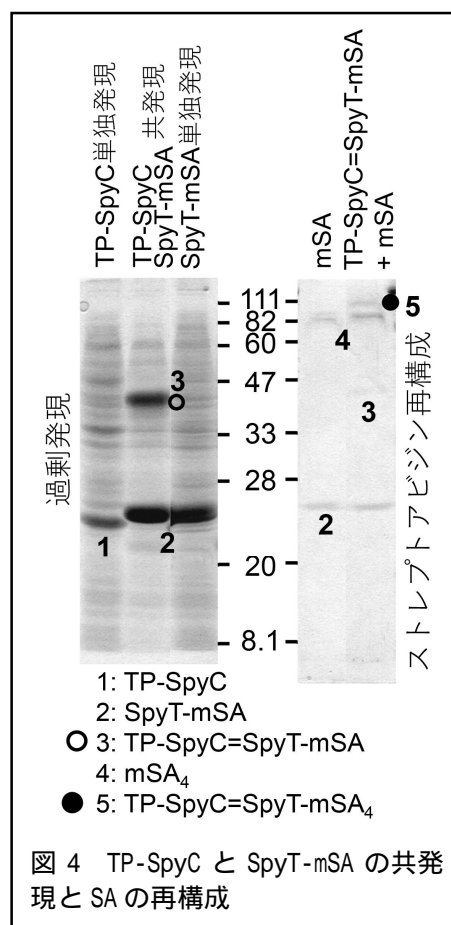


図4 TP-SpyCとSpyT-mSAの共発現とSAの再構成

<引用文献>

1. Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J., and Keegstra, K. Stable association of chloroplastic precursors with protein-translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J.*, **16**(5): 935-946 (1997)
2. Akita, M., Nielsen, E., and Keegstra, K. Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J. Cell Biol.*, **136**(5): 983-994 (1997)
3. Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E., and Keegstra, K. Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.*, **15**(16): 4230-4238 (1996)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. Inoue, H., Ratnayake, R.M., 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)
8. Akita, M. and Pohare, M. B. Chloroplastic Protein Import Characteristics of Dihydrofolate Reductase (DHFR) Fused Recombinant Precursor Protein in the Presence of Methotrexate. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* **13** (4): 2351-2358 (2016)
9. Howarth, M., Chinnapen, D.J., Gerrow, K., Dorrestein, P.C., Grandy, M.R., Kelleher, N.L., El-Husseini, A., Ting, A.Y. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat. Methods*, **3**(4): 267-273 (2006)
10. Chivers, C.E., Crozat, E., Chu, C., Moy, V.T., Sherratt, D.J., Howarth, M. A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability. *Nat. Methods*, **7**(5): 391-393 (2006)
11. Reznik, G.O., Vajda, S., Smith, C.L., Cantor, C.R., Sano, T. Streptavidins with intersubunit crosslinks have enhanced stability. *Nat. Biotechnol.*, **14**(8): 1107-1111 (1996)
12. Veggiani, G., Zakeri, B., Howarth, M. Superglue from Bacteria. *Trends Biotechnol.*, **32**(10): 506-512

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 秋田充, 菊地琢磨, 奥田隆平, 山本紗綺, 宮内優香, 大政幸輝, 斉藤祥子, 田口美和
2. 発表標題 SpyCatcher/SpyTagテクノロジーを用いた新規膜蛋白質配向性決定法
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会（第55回講演会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mitsuru Akita, Manoj Pohare Balirum, Yusuke Takikawa, Fumihito Suzuki
2. 発表標題 Isolation of Translocation Intermediate Formed during Protein Import into Chloroplasts
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------	---------