

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770176

研究課題名(和文) ミトコンドリア外膜蛋白質の輸送機構とその破綻の生理的意義

研究課題名(英文) Import mechanism of mitochondrial outer membrane protein and physiological significance of its import defect

研究代表者

大寺 秀典(OTERA HIDENORI)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40380612

研究成果の概要：ミトコンドリア外膜複数回膜貫通蛋白質は細胞質で合成された後、ミトコンドリア外膜へと輸送される。ミトコンドリア蛋白質輸送機構の研究は酵母を用いた遺伝学あるいは生化学的手法によりかなりの部分について明らかにされてきているが、複数回膜貫通蛋白質輸送の分子機構については現在まで全く不明であった。そこで本研究では複数回膜貫通蛋白質に焦点を当ててその輸送分子機構の解明を目指した。蛋白質が正しくその機能を発現するためには発現のタイミング、量およびその局在部位への輸送が厳密に制御される必要がある。ミトコンドリア蛋白質は細胞質リボソームで合成された後にミトコンドリアへと輸送され個々の蛋白質特有の機能を発現する。私は本研究で輸送の最初のステップである膜への標的化機構を明らかにする目的でミトコンドリア外膜蛋白質の網羅的発現抑制を行い複数回膜蛋白質輸送に異常を呈する因子の検索を行った。その結果、ミトコンドリア外膜蛋白質 Tom70 を同定した。Tom70 を RNAi により発現抑制するとミトコンドリア複数回膜貫通蛋白質の輸送が障害された。逆に過剰発現すると輸送が亢進された。さらにこれまで多くのミトコンドリア蛋白質輸送に際して重要な役割を果たすと考えられてきた外膜輸送チャネル Tom40 は複数回膜貫通蛋白質輸送には必要ないことを明らかにした。生化学的解析により複数回膜貫通蛋白質輸送には ATP を必要とすることも併せて明らかにした。数回膜貫通蛋白質のトポロジー形成には膜間スペース成分の要求性も認められた。本研究によりこれまで謎であったミトコンドリア外膜の複数回膜貫通蛋白質のトポロジー形成の分子機構の一端を明らかにすることができた(Journal of Cell Biology 2007)。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

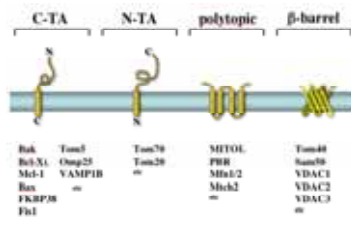
キーワード：生体膜

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア（以下 Mt と省略）は真核細胞に必須のオルガネラであり、細胞分化、細胞病変、環境ストレス変化に応じて膜の分裂・融合を介してその形態を変化させ細胞機能変換を行っている。また細胞内エネルギー産生の大部分を担うほか、アミノ酸代謝、ヘム合成、鉄-硫黄クラスター合成等様々な代謝反応の場である。Mt 蛋白質の99%は核ゲノムにコードされ、翻訳後に Mt 各コンパートメントに輸送され機能する。Bcl-2 ファミリー蛋白質などアポトーシスの制御因子あるいは実行因子の多くが Mt に局在し、Mt がアポトーシス制御の中心として機能することが明らかにされてきた。近年これら輸送および形態調節に関わる遺伝子の変異に起因する疾患が見いだされつつある。

【本研究の目的と関連する国内・国外研究の動向および位置付け】プロテオーム解析の結果、Mt は酵母で約800種類、ヒトで約1500種類の蛋白質から構成されていることが判明して



おりMt外膜輸送装置（TOM複合体）と内膜輸送装置（TIM複合体）によってMt内各コンパートメントへと輸送され機能する。これまで主に酵母Mtを用いた生化学および酵母遺伝学によりMt蛋白質の選別輸送と膜への組み込みの研究が盛んに行われてきた。この分野の現在の研究の興味は細胞質で合成された前駆体蛋白質の一次構造に含まれる配列情報を外膜輸送装置がどのように解読してMt外膜へ輸送し、膜に組み込むのかである。またアポトーシスに関連して主に哺乳動物細胞を用いた系でBcl-2ファミリー蛋白質のアポトーシスシグナルにตอบสนองした活性化機構と、それに準じるMt膜間スペースからのアポトーシス実行因子の放出（研究業績2）などが現在の研究の主流となっているが生化学的基礎に立脚した研究は少ない。

2. 研究の目的

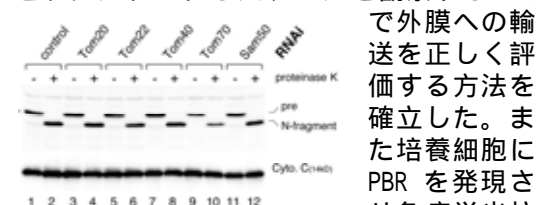
ミトコンドリアの生合成機構を理解する上で、構成蛋白質のトポロジー形成機構を理解することは必要不可欠である。すなわちミトコンドリアの多彩な機能を支える構成蛋白質の正しい配向性の形成機構の解明は人工の機能性細胞内小器官の作製にも将来的には繋がる基礎的研究である。蛋白質は個々のアミノ酸配列上に固有の配送シグナルを持つ。そのシグナルを認識して各蛋白質が正しく

く配送されるシステムの解明は細胞生物学的に非常に重要である。多くのミトコンドリア蛋白質についてはその輸送機構の概要が既に解明されているが複数回膜貫通蛋白質については現在までその分子機構は不明である。そこでこの分子機構を解明することを本研究課題の目的とした。Mt がアポトーシスに中心的役割を果たすことが明らかになって以来、哺乳類の細胞機能調節に関わるMtの研究は多くの研究者が参入しホットな研究領域になっている。しかしほとんどの研究はアポトーシスに関連してBcl-2蛋白質群、Mt形態に関連して低分子量GTPaseであるMfn1, 2（融合）、Drp1（分裂）など直接Mt膜を介して機能変換を行う分子の機能あるいは活性調節といった研究に向けられている。しかし多様な細胞機能を発現する根幹は蛋白質を“本来あるべき正しい場所へと局在化させる”輸送機構であり、その基礎的研究を展開していくことが是非とも必要である。Mt外膜輸送装置（TOM複合体）自体が細胞機能調節（アポトーシスやMt形態など）さらにそれらに起因する神経変性疾患などに関与していることは確実であるがそのような研究はこれまでほぼ皆無である。

Mt研究の分野でも系統的な遺伝学的解析ができる酵母など、変異クローンを多く持っている研究室が圧倒的に優位に研究を進めてきた。このような優位性を今後動物細胞でも得るため変異細胞を系統的に作製することは非常に意義深いと思われる。本研究には蛋白質による分子認識、シグナル伝達、ストレス応答、アポトーシス、病気など極めて興味深い多様な細胞機能のモデルとなる問題が含まれており医学の周辺領域に極めて大きな貢献ができると期待する。

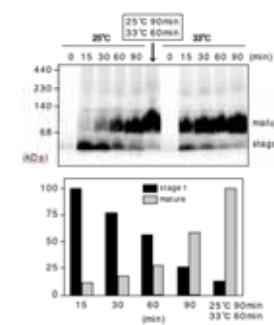
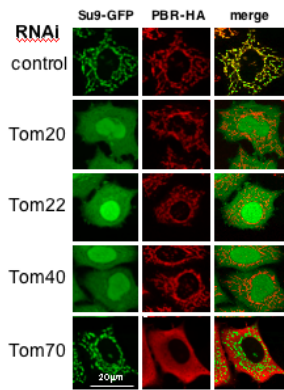
3. 研究の方法

ミトコンドリア外膜蛋白質は輸送後、プロセッシングあるいは糖鎖などの修飾を受けなため輸送を試験管内で評価することが困難であった。私はミトコンドリア外膜複数回膜貫通蛋白質のモデルとしてPBRを用いこれが外膜輸送後、プロテアーゼ消化によりプロセッシングされるパターンを観察すること



で外膜への輸送を正しく評価する方法を確立した。また培養細胞にPBRを発現させ免疫蛍光抗体染色法により顕微鏡観察する手法とを組み合わせるとPBR輸送をin vitroおよびin

vivo で評価する系を確立した。本実験系を用いて以下の実験を行った。ミトコンドリア外膜蛋白質を RNAi により網羅的に発現抑制した後、ミトコンドリア外膜複数回膜貫通蛋白質のモデル蛋白質 PBR の輸送を培養細胞にて観察した。輸送異常を呈する遺伝子産物を同定した後、in vitro 系にて再度確認した。またラット肝臓から精製したミトコンドリアとウサギ網状ライセートにて合成した PBR をインキュベートしプロテアーゼ消化することによりその輸送の対する ATP あるいは膜間スペース要求性を調べた。また蛋白質を複合体のまま分離できる BN-PAGE により輸送中間体の経時観察を行って輸送反応の素過程を解析した。



観察を行って輸送反応の素過程を解析した。

#### 4. 研究成果

RNAi スクリーニングの結果、ミトコンドリア外膜複数回膜蛋白質輸送に必要な因子として TPR モチーフを有するミトコンドリア外膜蛋白質 Tom70 を同定することができた。TOM70 の発現抑制により PBR のほか MITOL あるいは Mfn といったミトコンドリア外膜複数回膜貫通蛋白質についても輸送障害が引き起された。逆に TOM70 過剰発現によりこれら複数回膜貫通蛋白質の輸送の促進が見られた。また Tom70 は PBR などのモデル蛋白質と Hsp90 など同時に結合し、ミトコンドリア輸送過程の中でもその初期過程である膜表的化ステップに機能することを明らかにすることができた。

BN-PAGE による輸送過程の解析から PBR のトポロジー形成に際して標的化複合体が形成されたのち ATP 依存的に速やかにトポロジーが形成されこの過程に外膜透過チャネルである Tom40 が関与しないことを明らかにした。さらに外膜内でのトポロジー形成過程にお

いて膜間スペースの低分子量シャペロンの機能を要求することを明らかにした。この輸送機構はミトコンドリア外膜 C 末アンカー蛋白質輸送システムと競合することも併せて明らかにした。哺乳動物細胞系を用いた同様の研究例はこれまで報告されておらず本研究成果が世界で唯一であることから今後、哺乳動物培養細胞によるミトコンドリアあるいは関連オルガネラ蛋白質輸送機構研究が急速に進展するものと期待される。

いて膜間スペースの低分子量シャペロンの機能を要求することを明らかにした。この輸送機構はミトコンドリア外膜 C 末アンカー蛋白質輸送システムと競合することも併せて明らかにした。哺乳動物細胞系を用いた同様の研究例はこれまで報告されておらず本研究成果が世界で唯一であることから今後、哺乳動物培養細胞によるミトコンドリアあるいは関連オルガネラ蛋白質輸送機構研究が急速に進展するものと期待される。

ミトコンドリア外膜蛋白質輸送機構の破綻とその生理的意義に関連してミトコンドリア外膜蛋白質の輸送装置の品質管理について解析した。そのモデルとしてミトコンドリア Tom20 についてその分解機構を調べた結果、Tom20 がミトコンドリア外膜でユビキチン-プロテアソーム系により分解されていることを明らかにした。さらにこの分解がその結合パートナーである Tom22 に依存するがその他の Tom には依存しないことを明らかにしその分解調節機構の一端を見出した。ミトコンドリア外膜蛋白質はパルスチェイス実験により比較的長寿命であるが、Tom20 は比較ターンオーバーが早い。Tom20 を HeLa 細胞に過剰発現させプロテアソーム阻害剤によりその分解を阻害すると高頻度でアポトーシスが誘発されることを見出した。これはプロテアソームにより分解されないミトコンドリア外膜蛋白質では認められないことからミトコンドリア外膜品質管理システムが細胞のストレス防御機構に関与している可能性を見いだすことができた。現時点では Tom20 をユビキチン化する E3 リガーゼの発見には至っていないが近年ミトコンドリア外膜局在型ユビキチン E3 リガーゼが幾つか報告されつつある。そこでこれらの候補因子の RNAi あるいは過剰発現等により Tom20 の品質管理に必要な E3 リガーゼの同定が可能になるものと考えている。

#### 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1件)

Otera H, Taira Y, Horie C, Suzuki H, Setoguchi K, Kato H, Oka T, \*Mihara K. A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments. *J. Cell. Biol.*, **179**, 1355-1363 (2007)

〔学会発表〕(計2件)

(1) 大寺秀典、三原勝芳

第40回日本発生生物学会第59回日本細胞生物学会合同大会、平成19年5月30日

(福岡市)

(2) 徳重博文、大寺秀典、三原勝芳  
第31回日本分子生物学会第81回日本生  
化学会合同大会、平成20年12月9日(神  
戸市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseib  
utu/publication.html](http://www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/publication.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大寺 秀典 (OTERA HIDENORI)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40380612