

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02583

研究課題名（和文）動作中のミトコンドリア膜透過装置TOM複合体を通過する前駆体タンパク質の動態解析

研究課題名（英文）Dynamic analysis of precursor proteins passing through the translocase of the mitochondrial outer membrane complex

研究代表者

荒磯 裕平（Araiso, Yuhei）

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：20753726

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアへのタンパク質搬入ゲートTOM複合体の過剰発現株を構築し、精製試料を用いてHS-AFM解析を行った。精製TOM複合体は溶液中で3量体構造をとり、安定なコア2量体と単量体へ解離しやすいことが示唆された。さらに観察中のTOM複合体に基質タンパク質を添加し、両者の相互作用をリアルタイム観察する実験系を確立した。様々な基質タンパク質を用いて、TOM複合体による基質認識領域の同定を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TOM複合体は3量体と2量体の二つの分子種が混在した不均一状態であり、TOM複合体の機能の実態に迫るには、狙ったフォームだけを取り出して1分子解析する新規手法の確立が必要である。我々はHS-AFMを用いて3量体TOM複合体の解離と基質認識機構を観察し、従来手法では解析することの難しかったTOM複合体のダイナミクスを可視化することができた。本成果を起点にTOM複合体の新たな分子機構解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：The TOM complex was purified from a yeast overexpressing strain. HS-AFM analysis demonstrated that the purified TOM complex forms a trimeric structure in solution and tends to dissociate into a stable core-dimer and a peripheral monomer. Furthermore, we succeeded in real-time imaging of interaction between the TOM complex and mitochondrial precursor proteins, in which a substrate protein is added to the TOM complex under HS-AFM observation. We are currently attempting to identify the substrate-binding region of the TOM complex by applying various substrates.

研究分野：構造生物化学、生化学、ナノバイオサイエンス

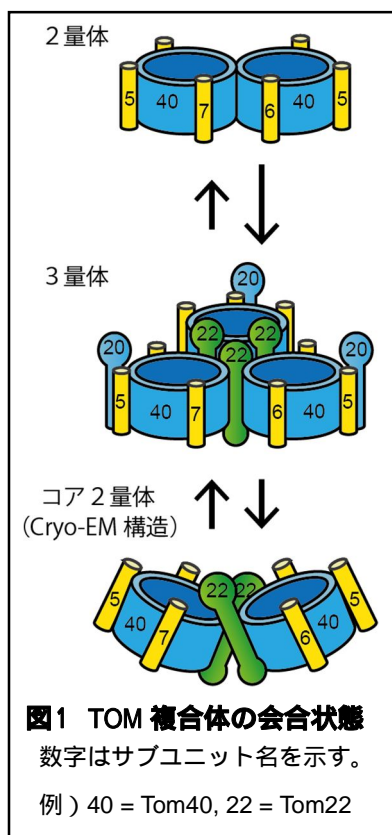
キーワード：ミトコンドリア タンパク質輸送 TOM複合体 膜タンパク質複合体 高速原子間力顕微鏡

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは外膜と内膜の2枚の膜構造を持つオルガネラで、生命活動に必要なエネルギー生産や代謝反応の中核を担っている。TOM (Translocator of the outer mitochondrial membrane) 複合体はミトコンドリア外膜に存在する膜透過装置で、パレル型チャネルタンパク質 Tom40 と他の6つのサブユニットで構成される膜タンパク質複合体である。サイトゾルで合成された1,000種類に及び前駆体ミトコンドリアタンパク質の約99%がTOM複合体を通過してミトコンドリアに取り込まれる。TOM複合体の高分解能立体構造は長きに渡って不明であったが、中程度分解能(約18Å)での電子顕微鏡解析や生化学的な相互作用解析によって、3つのタンパク質透過チャネル(Tom40チャネル)がTom22サブユニットによって連結された3量体として機能することが示唆されていた (Model, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2008, Shiota, *et al.*, *Science*, 2015)。2019年初頭に、研究代表者らはクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) 解析によってTOM複合体の高分解能立体構造を世界で初めて決定した (Araiso, *et al.*, *Nature*, 2019)。構造解析により、TOM複合体のチャネル内部には前駆体ミトコンドリアタンパク質の効率的な膜透過のための独立した“通り道”が備わっていることが明らかとなり、ミトコンドリアタンパク質輸送研究が大きく進展した。

しかし、Cryo-EM解析で解き明かされたTOM複合体の立体構造は2つのTom40チャネルが2つのTom22サブユニットによって連結されたコア2量体であり、これまで機能型と考えられていた3量体との関係性について未解決の問題が残った。さらに先行研究において、TOM複合体の一部は、Tom22サブユニットを持たず、2つのTom40チャネルが直接連結された2量体として存在することが示されており (Shiota, *et al.*, *Science* 2015) Tom22の有無によって区別される2種類の2量体同士の関係性についても不明な点が多い。すなわち、TOM複合体には3量体と2量体、コア2量体の少なくとも3種類のアッセムブリ状態が存在し、これらはミトコンドリア膜上で動的平衡にあると考えられる (図1)。そのため、ミトコンドリアへのタンパク質輸送機構の実態に迫るためには、TOM複合体の一つ一つの状態の“静的な高分解能構造のスナップ写真”(Cryo-EM構造)を解析するだけでなく、複数状態の平衡として構造解析し、TOM複合体の“動作する様子を動画として解析すること”が必要になる。研究代表者は、このような学術的必要性を鑑み、100ミリ秒の時間分解能とナノメートルの空間分解能で動的構造解析を実現可能な高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) によってTOM複合体のダイナミクス解析に取り組んだ。



2. 研究の目的

本研究では、(A) TOM複合体に複数のアッセムブリ状態が存在する理由、ならびに異なるアッセムブリ状態間を行き来する構造変換機構、及び(B)約1,000種類の多様なミトコンドリアタンパク質がTOM複合体に認識され、膜透過する分子機構に着目し、TOM複合体のHS-AFM解析を試みた。TOM複合体が構造変換を起こし、3量体と2量体を行き来する瞬間を直接的に捉え、様々な前駆体ミトコンドリアタンパク質を用いてTOM複合体による認識、さらにはチャネル内部を通過する様子を可視化する。ミトコンドリアタンパク質の種類に応じてアッセムブリ状態の使い分け機構が存在するかどうかを検証する。これらの解析によって、TOM複合体が動的な構造変換を繰り返しながら多様な前駆体ミトコンドリアタンパク質を輸送する分子機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) TOM複合体の精製

TOM複合体の各サブユニットの5'末端にガラクトースによる過剰発現が可能なGal1プロモーターを融合し、さらにTom40チャネルのC末端にStrepタグ、Tom22サブユニットのC末端にはヒスチジンタグを導入した。これら全てのサブユニットをライゲーションして作成した発現カセットを出芽酵母のゲノムに組み込み、TOM複合体の過剰発現株を作成した。

2-4リットルのYPD培地でTOM複合体の過剰発現株を培養し、ガラクトースにより遺伝子発現を誘導後に約16時間培養して回収した細胞からミトコンドリア膜画分を単離した。界面活性剤GDN条件下でミトコンドリア膜画分を可溶化し、Strepタグによるアフィニティ精製によってTOM複合体を精製した。さらに試料をゲルろ過クロマトグラフィーにかけ、均一性を評価

するとともに最終精製した。得られた精製試料を Blue-Native PAGE によって分析し、予測分子量・構成サブユニットについて評価した。

(2) TOM 複合体の HS-AFM 解析 [研究目的 A]

精製 TOM 複合体を用いて HS-AFM 解析を行った。TOM 複合体を観察基板上に安定して固定するため、マイカ基板には APTES をコートした。HS-AFM で得られた TOM 複合体粒子の分子像に、PDB ファイルから予測した HS-AFM 像をフィッティングし、HS-AFM データを評価した。

(3) TOM 複合体と基質タンパク質の相互作用のリアルタイム観察 [研究目的 B]

モデル基質タンパク質には、呼吸鎖複合体 V の構成サブユニット ATP9 のミトコンドリア移行シグナル配列 (pSu9) を N 末端に融合したデヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) を用いた。pET ベクターにクローニングし、大腸菌発現系によって pSu9-DHFR を高純度精製し、観察中の TOM 複合体に添加した。添加後の pSu9-DHFR のダイナミクスを解析し、TOM 複合体粒子との相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) TOM 複合体の精製

TOM 複合体の過剰発現株を構築し、均一な TOM 複合体試料の精製に成功した。ゲルろ過クロマトグラフィー、Blue-Native PAGE によって、Tom40, Tom22, Tom20, Tom7, Tom5 サブユニットを含む分子量約 450kDa の TOM 複合体が得られたことを確認した。

(2) TOM 複合体の HS-AFM 解析

界面活性剤 GDN を含む溶液中の TOM 複合体のダイナミクスを HS-AFM によって解析した。マイカ基板に APTES をコートし弱い正電荷を与え、TOM 複合体の構造解析に適した観察条件を最適化した。その結果、精製 TOM 複合体は均一な 3 量体構造をとっていることが明らかになった (図 2 A)。分子中心部の輝度が高く、Tom22 サブユニットの N 末端レセプター領域の存在が考えられる。また、マイカ基板に塩化ニッケルをコートした条件においても同様の粒子が観察された。TOM 複合体の構成サブユニット Tom22 の C 末端側 (ミトコンドリア膜間に露出している) にはヒスチジンタグが付加され、ニッケルイオンとの相互作用が考えられることから、本研究で得られた TOM 複合体粒子はすべてサイトゾル側から見た Top view としてイメージングされていることが示唆された (図 2 B)。以後の観察は、ダイナミクス観察が容易な APTES 条件下で進めた。

TOM 複合体の HS-AFM 観察を続けていくなかで、3 量体は 2 量体と単量体に容易に解離することが明らかになった (図 2 C)。ここで計測された 3 量体、2 量体の HS-AFM 像は、3 量体のモデル構造、コア 2 量体の Cryo-EM 構造から構築した予測 HS-AFM 構造とよく一致することも示唆された。以上の結果より、精製 TOM 複合体は溶液中において 3 量体構造をとっているが、等価な 3 つの単量体が集合しているのではなく、安定なコア 2 量体構造に不安定な単量体が結合した (2 + 1) 型の 3 量体構造をとっていることが示唆された。これらの結果は、現在論文投稿準備中である。

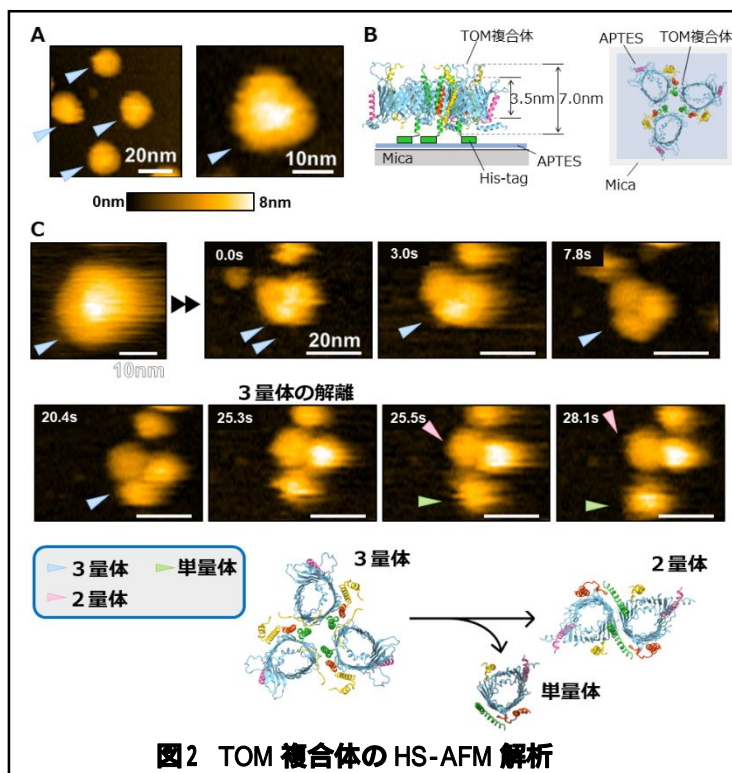


図2 TOM 複合体の HS-AFM 解析

(3) TOM 複合体と基質タンパク質の相互作用のリアルタイム観察

モデル基質タンパク質 pSu9-DHFR を精製し、観察中の TOM 複合体に添加したところ、pSu9-DHFR がマイカ基板上を動き回る様子を可視化することができた (図 3 A)。さらに pSu9-DHFR 分子が 3 量体 TOM 複合体と結合する瞬間をリアルタイム観察することに予備的に成功した (図

3 B) 現在はミトコンドリア移行シグナル pSu9 配列を除いた DHFR を用いて同様の観察を行い、pSu9 配列の有無による TOM 複合体 DHFR 間の相互作用の違いを定量化することを試みている。本解析により、3 量体 TOM 複合体の基質タンパク質結合領域の同定が可能となり、ミトコンドリアタンパク質輸送機構の分子機構の一端が新規解明されることが期待できる。

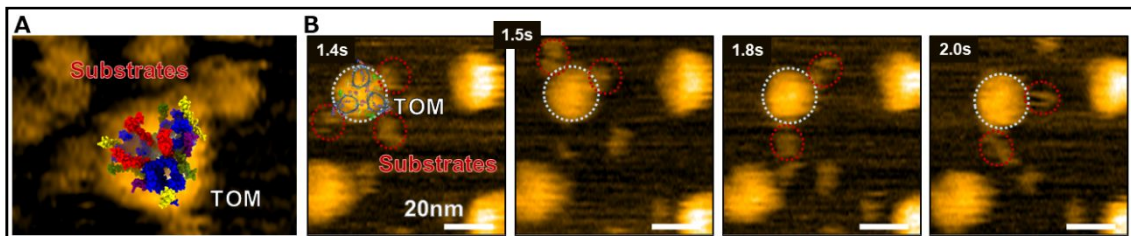


図3 TOM 複合体と基質タンパク質の HS-AFM 解析

A) TOM 粒子に 3 量体モデルをフィッティングし、pSu9-DHFR の結合が示唆された。

B) TOM を白丸、pSu9-DHFR を赤丸で示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuhei Araiso, Kenichiro Imai, Toshiya Endo	4. 巻 91
2. 論文標題 Role of the TOM complex in Protein Import into Mitochondria: Structural Views	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Review of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 679-703
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1146/annurev-biochem-032620-104527.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuhei Araiso, Toshiya Endo	4. 巻 19
2. 論文標題 Structural overview of the translocase of the mitochondrial outer membrane complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 e190022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v19.0022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Araiso Yuhei, Imai Kenichiro, Endo Toshiya	4. 巻 288(18)
2. 論文標題 Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5300-5310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15661	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 九筈 加菜、今井 大達、古寺 哲幸、稲津 明広、遠藤 斗志也、荒磯 裕平
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡を用いたミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の動的構造解析
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuhei Araiso, Akihisa Tsutsumi, Kenichiro Imai, Takuya Shiota, Hirotsu Imai, Kana Kuzasa, Noriyuki Koderu, Masahide Kikkawa, Toshiya Endo
2. 発表標題 Structural analysis of the mitochondrial protein import gate by near-atomic resolution snapshot and nanoscale video imaging
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kana Kuzasa, Hirotsu Imai, Noriyuki Koderu, Akihiro Inazu, Toshiya Endo, Yuhei Araiso
2. 発表標題 High-Speed atomic force microscopy analysis of the mitochondrial protein import gate TOM complex
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 九笹 加菜、小林 菜々子、今井 大達、槇野 愛実、稲津 明広、古寺 哲幸、遠藤 斗志也、荒磯 裕平
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の構造とダイナミクス
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒磯裕平
2. 発表標題 ミトコンドリアへのタンパク質搬入ゲートTOM複合体の構造と機能
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第46回討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒磯裕平
2. 発表標題 Structure of the mitochondrial protein import gate reveals distinct protein path
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 若手奨励賞シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒磯裕平
2. 発表標題 ミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の 構造とダイナミクス
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第40回大会 支部奨励賞受賞講演 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 九笹加菜、小林菜々子、今井大達、槇野愛実、稲津明広、古寺哲幸、遠藤斗志也、荒磯裕平
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲート
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒磯裕平、包明久、今井賢一郎、塩田拓也、吉川雅英、遠藤斗志也
2. 発表標題 ミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の電子顕微鏡構造
3. 学会等名 第8回 がんと代謝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒磯裕平、九笹加菜、小林菜々子、今井大達、槇野愛実、稲津明広、古寺哲幸、遠藤斗志也
2. 発表標題 High-speed atomic force microscopy analysis of the mitochondrial import gate TOM complex
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林菜々子、九笹加菜、今井大達、川合志朋、槇野愛実、稲津明広、古寺哲幸、遠藤斗志也、荒磯裕平
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過装置TOM複合体の高速原子間力顕微鏡解析
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒磯裕平、小林菜々子、Romain Amyot、九笹加菜、今井大達、川合志朋、今井賢一郎、稲津明広、古寺哲幸、遠藤斗志也
2. 発表標題 ミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の構造とダイナミクス
3. 学会等名 令和4年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荒磯 裕平、小林 菜々子、九笹 加菜、Romain Amyot、今井 大達、川合 志朋、今井 賢一郎、稲津 明広、古寺 哲幸、遠藤 斗志也
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過装置TOM複合体による基質タンパク質認識機構の一分子解析
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第41回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林菜々子、九笹加菜、今井大達、川合志朋、稲津明広、古寺哲幸、遠藤斗志也、荒磯裕平
2. 発表標題 ミトコンドリア膜透過装置TOM複合体の高速原子間力顕微鏡解析
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>金沢大学医薬保健研究域保健学系 検査技術科学専攻 教員紹介 https://lab-science.w3.kanazawa-u.ac.jp/member-araiso.html</p>

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
研究協力者	河野 慎 (Kawano Shin)		
研究協力者	今井 大達 (Imai Hirotsu)		

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
---------	---------