

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009-2011

課題番号：21580415

研究課題名（和文） 高等植物葉緑体への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 Translocation Intermediates Formed during Protein Import into Chloroplasts in Higher Plants

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

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。輸送過程で包膜透過に必要なエネルギーを制限すると、トランスロコン中で前駆体輸送が停止した初期膜透過中間体を形成する。本研究期間内では、この中間体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間の分子間相互作用を時間と空間の二面から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 translocon embedded in the double-envelope membranes from the cytosol after translated as precursors. Under limited energy conditions, precursors are trapped at the translocon to form the early-translocation intermediates. During the research period, I have established the experimental systems to analyze the protein-protein interactions between precursors and the translocon component(s) and intra-interactions within the translocon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：蛋白質膜透過、葉緑体、前駆体蛋白質、蛋白質間相互作用

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

①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。

②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、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

①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

②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1,2）。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2,3）。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。

③一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2,4）。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、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。

<引用文献>

1. **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)
2. **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)
3. **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)
4. **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)

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との相互作用が不可欠である。上で述べた当初の背景及びこれまでの成果から、異なる初期膜透過中間体を獲得することができるようになった。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での分子間相互作用を、空間と時間の二つの軸から解析することで、蛋白質輸送の重要ステップの一

つ、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における分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでの成果を踏まえ、以下の課題に取り組んだ。

(1) 架橋複合体の同定

部位特異的に光反応性架橋剤で修飾したリコンビナント前駆体蛋白質を用いて、大量に調製した葉緑体とドッキングさせ、紫外光を照射することで、架橋複合体を形成させた。前駆体蛋白質は、C末端にヘキサヒスチジンタグ(Hisタグ)を持っている(図1)ので、架橋反応に供した葉緑体の蛋白質を可溶化した後、メタルアフィニティークロマトグラフィーによって架橋複合体の精製を試みた。

(2) 精製用アフィニータグの選択

①Hisタグを利用した精製に難があったので、精製に適したタグをスクリーニングするために、これまで同様 Rubisco 小サブユニット前駆体蛋白質(prSS)遺伝子に種々のタグをコードする遺伝子を連結(図1)した発現プラスミドを作製し、大腸菌で過剰発現した。

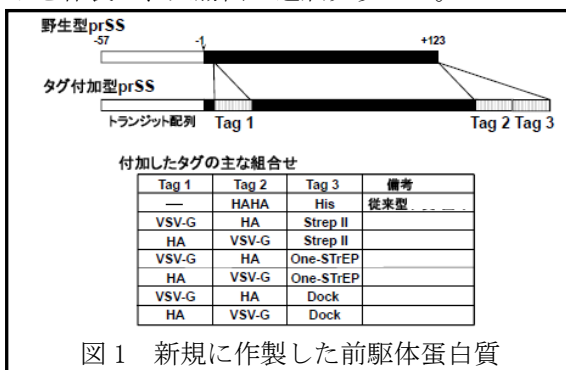


図1 新規に作製した前駆体蛋白質

②新たに連結したタグの有用性を確認するために、過剰発現した前駆体蛋白質を用いて葉緑体と初期膜透過中間体を形成させ、界面活性剤を用いて葉緑体膜蛋白質を可溶化後、それぞれのタグの精製に合致した樹脂を用いて前駆体蛋白質を精製した。

(3) 蛍光を用いた新規葉緑体蛋白質輸送実験系の開発

エピトープタグをイムノブロットングで検出することにより、リコンビナント蛋白質

を用いた蛋白質輸送実験系をこれまでに開発してきたことについては、上で述べたが、前駆体蛋白質検出方法の選択肢をイムノブロットング以外に広げるために、蛍光の利用を計画した。システイン残基を一つだけ持つリコンビナント前駆体蛋白質のSH基を蛍光色素で修飾した前駆体蛋白質を用いて、*in vitro*葉緑体蛋白質輸送実験を行い、その有用性を検討した。

(4) *in vitro* 翻訳産物の葉緑体蛋白質輸送研究への検討

リコンビナント前駆体蛋白質を用いた *in vitro* 蛋白質輸送実験系はメリットが大きい一方、膜蛋白質のように過剰発現が困難な前駆体蛋白質も存在する。膜蛋白質の膜への挿入は、蛋白質輸送と密接に関連しているので、本研究と同様の手順で膜蛋白質の挿入機構研究を将来行うことを想定し、無細胞合成した蛋白質の有用性を検討した。蛋白質合成にあたっては、大量合成が可能な愛媛大学遠藤らの開発したコムギ胚芽抽出物を用い、11回膜貫通領域を有する内包膜蛋白質を合成し、葉緑体への輸送実験を行った。

4. 研究成果

本項における枝番号は、前項「研究の方法」の枝番号に対応している。

(1) 架橋複合体の同定

Hisタグ精製用樹脂を用いて、架橋産物の精製を試みたが、銀染色で確認できる程度の精製産物を獲得することができなかった。

(2) 精製用アフィニータグの選択

①図1に示すタグを有する前駆体蛋白質を作製した。

②Strep II及びOne-STrEPタグに対しては、Strep-Tactinアフィニーターゼンを、Dockタグに対してはDock Catch Resinを用いて葉緑体に結合した前駆体蛋白質の精製を行ったところ、Dockタグ融合蛋白質において最も良好な結果が得られた。

(3) 蛍光を用いた新規葉緑体蛋白質輸送実験系の開発

C末端システイン残基のSH基を介してフルオレセインを付加した前駆体蛋白質を用いて、*in vitro*蛋白質輸送実験を行った。葉緑

体蛋白質を分離したポリアクリルアミドゲルを直接フルオロイメーリアライザーで解析することで、電気泳動直後に解析結果が得られる一方で、従来のイムノブロッティングと比較して検出限界に優れていた(図 2)。また、GFP などの蛍光蛋白質と違い、変性による影響を受けないメリットがあった。

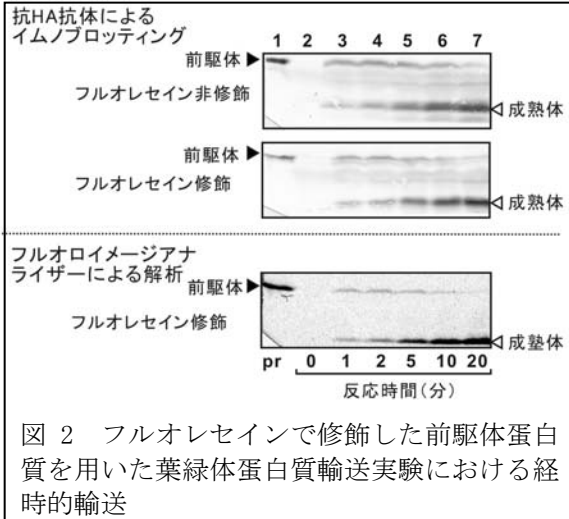
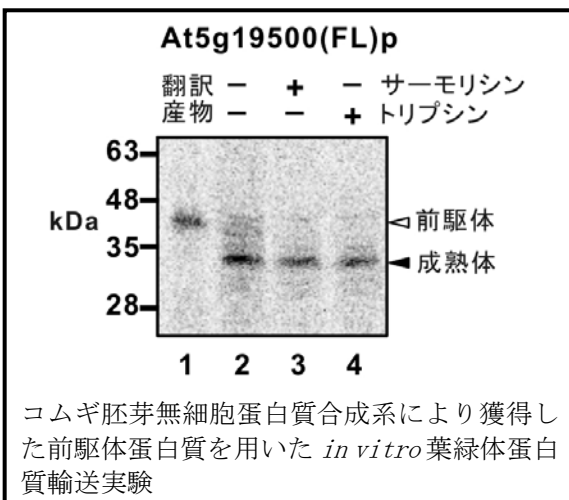


図 2 フルオレセインで修飾した前駆体蛋白質を用いた葉緑体蛋白質輸送実験における経時的輸送

(4) *in vitro* 翻訳産物の葉緑体蛋白質輸送研究への検討

シロイヌナズナ At5g19500 遺伝子産物は、内包膜で 11 回膜を貫通することが予測される膜蛋白質であり、N 末端にトランジット配列と予測される配列を持つ。この遺伝子産物は、大腸菌では過剰発現されなかったが、コムギ胚芽系無細胞蛋白質合成系により獲得できた(図 3, レーン 1)。この翻訳産物を *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験に供すと、葉緑体に輸送され、プロセスされた(図 3, レーン 2-4)。さらに、輸送された蛋白質の葉緑体内局在を調べたところ、内包膜に局在していた。



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 Nomura, Y., Takabayashi, T., Kuroda, H., Yukawa, Y., Sattasuk, K., Akita, M., Nozawa, A., and Tozawa, Y. ppGpp inhibits peptide elongation cycle of chloroplast translation system *in vitro*. *Plant Mol. Biol.*, **78**(1-2): 185-196 (2012) [査読有]
- ② Sattasuk, K., Nozawa, A., Tozawa, Y., Kakinuma, Y., and Akita, M. *In vitro* protein import of a putative amino acid transporter from *Arabidopsis thaliana* into chloroplasts and its suborganellar localization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(11): 2200-2206 (2011) [査読有]
- ③ Sattasuk, K., Inoue, H., and Akita, M. *In vitro* fluorescent analysis of preprotein import into chloroplasts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**(10): 2001-2007 (2011) [査読有]

[学会発表] (計 5 件)

- ① Sattasuk, K., 清水綾子, 秋田充. シロイヌナズナ由来大腸菌 TyrP 相同蛋白質の機能解析. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都, 3 月 25 日, (2012)
- ② Sattasuk, K., Nozawa, A., Tozawa, Y., Kakinuma, Y., and Akita, M. *In vitro* protein import of a putative amino acid transporter from *Arabidopsis thaliana* into chloroplasts and its suborganellar localization. Protein Island Matsuyama International Symposium, Matsuyama, September 22, (2011)
- ③ Sattasuk, K. and Akita, M. The targeting properties of the putative chloroplastic protein in the inner envelope membrane. The 3rd International Symposium on "Protein Community", Nara, September 14, (2010)
- ④ Akita, M. and Inoue, H. The analysis of the movement of the targeting signal on the precursor protein during the transition of early translocation intermediates formed during protein import into chloroplasts. Plant Biology 2009, Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America, Honolulu, HI, USA,

July 19-21, (2009)

- ⑤ Sattasuk, K. and Akita, M. Targeting of a chloroplastic inner envelope membrane protein carrying a putative targeting signal. Plant Biology 2009, Plant Biology 2009, Joint Annual Meetings of the American Society of Plant Biologists and the Phycological Society of America, Honolulu, HI, USA, July 19-21, (2009)

[図書] (計1件)

- ① 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. 研究組織

(1) 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