

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650017

研究課題名(和文) 精製超分子複合体を用いた葉緑体蛋白質膜透過反応の完全再構成と構造ダイナミズム

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

研究代表者

中井 正人 (Masato, Nakai)

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の複雑な代謝機能は様々な蛋白質が生体膜を隔てて特異的に運ばれる事で維持される。さまざまな膜系で異なる蛋白質を膜透過させる分子装置、すなわちトランスロコンが構築されているが、これらは、生じた進化的起源が異なり、したがって、その分子組成も分子メカニズムも異なっている。われわれは、植物葉緑体のトランスロコンの因子にタグ配列を付加させたトランスジェニック植物を作成し、その精製標品を用いた葉緑体トランスロコンの構造と機能に迫りたいと考えている。これまでの結果から、高度に精製できる事が分かった。今後は、さらに収量を上げるために、スケールアップと精製効率の向上を進めていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Every cell and cell organelles are surrounded by lipid bilayers which consist of hydrophobic core and therefore act as a barrier for both small and macro molecules such as proteins. Specific molecular machineries called translocon are required to achieve this task. We have been trying to elucidating molecular structure and molecular mechanisms of chloroplast translocons by using transgenic plants expressing tagged components of chloroplast translocons. To date, we have succeeded in preparing such transgenic plants and purified translocons. Further improvements will be needed to bulk up the scale of the purification.

研究分野：植物分子細胞生物額

キーワード：葉緑体 トランスロコン 蛋白質複合体 蛋白質輸送

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の細胞内輸送と膜透過の問題は現代細胞生物学上の主要研究課題であり、日本も含め世界中の多くの研究者が、様々な生物の様々なオルガネラ膜を研究対象に多くの知見を積み上げてきた。今日でも非常にアクティブな研究分野であり、研究成果は生物学や医学の分野の発展にも大きな影響を与えてきた。歴史的には輸送経路の探索に始まり、そこに関与する因子の同定、輸送過程・膜透過の詳細な生化学的解析、輸送装置・膜透過装置の静的な立体構造の解明、さらにはそれらの動的な立体構造変化の解析へと、広く発展して進んできている。中でも、蛋白質のような巨大分子が、疎水性コアを持つバリアである生体膜をいかに通過して運ばれるかという問題は、細胞生物学者だけでなく生物物理学者からも大変興味深い研究課題として注目を集めている。

蛋白質の膜透過装置の解析で最も進んでいるのは SEC と呼ばれる原核生物型の蛋白質膜透過装置であり、輸送モーターも含め膜透過再構成系も構築されている。真核生物小胞体膜にも進化的起源が同じ SEC 装置が存在し、これらに関しては構造機能両面から解析が進んでいる。しかし、生命は、SEC 以外に、いくつかの異なる蛋白質膜透過装置を生み出してきた。ミトコンドリアの TOM・TIM や、ペルオキシソーム PEX、そして本申請のターゲットである葉緑体の TIC 等がそうである。興味深いのは、これらが全く異なるサブユニット組成をしており、また異なる輸送モーターを使い、したがって輸送の分子メカニズムもかなり異なっていると予想される事である。

本研究で着目している葉緑体内包膜特有の蛋白質輸送装置 TIC は、そもそもの葉緑体における含量が極めて少なく、取り扱いのマルチサブユニットからなる難しい疎水性の高い膜蛋白質超分子複合体であり、われわれの研究室において、ごく最近に世界で初めて精製同定したものである。加えて、この TIC トランスロコン (チャンネル本体) と共同して働く輸送モーター複合体として最近精製と同定に成功した 2 メガダルトン膜複合体に関しても、まったく新奇なもので未発表データであり、従って、いずれの複合体に関しても、我々の研究室と同レベルでこれら複合体を精製・解析する技術や実験材料を持っているところは現時点では皆無であると思われる。

実は、真核生物型の蛋白質膜透過装置に関しては、トランスロコンの再構成の例は少数あるものの、輸送モーターとの複合体として再構成した例はほとんどない。今回の試みが成功すれば、膜透過が完了するまでの全過程

について、例えば、前駆体蛋白質がどの段階でどの複合体のどのサブユニットのどの領域で相互作用しているのか、蛋白質の膜透過に伴うトランスロコンと輸送モーターの相互作用様式はどう変化するのか、等を詳細に解析できる非常に有益な実験系になると考えている。また、原核生物型 SEC の作動原理との共通点・相違点も見えてくると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、まず葉緑体のトランスロコンやモーター複合体を高度にアフィニティ精製する事を目指す。そして、スケールアップした精製方法が確立できれば、精製標品をリポソームやナノディスクに組み込み、それを利用する事で、それらメガコンプレックスの構造と機能を解明する事を、目標とする。

本研究では、TIC トランスロコンと輸送モーターという二つの膜複合体を超分子複合体として一括精製し、リポソームに組み込む事で、蛋白質膜透過過程の完全再構成系を構築し詳細な生化学的解析による反応素過程の解明にチャレンジしようというアイデアに至った。これまで、精製した TIC 複合体単独では、リポソームへの組み込みから膜チャンネルの確認、前駆体との相互作用の確認まではできている。従って、TIC と輸送モーターの超分子複合体に関してもリポソーム再構成系の構築までは、短期間のうちに達成できるのではないかと考えている。この完全再構成系構築のチャレンジが成功すれば、輸送される精製前駆体蛋白質を用いた詳細な生化学的解析により、蛋白質膜透過の全過程について、前駆体とトランスロコンと輸送モーターについて 1 : 1 : 1 の化学量論的観点からの議論が可能となる。

3. 研究の方法

これまでに申請者の研究室では、TIC 複合体および輸送モーター複合体のそれぞれの中核コンポーネントにアフィニティ精製のタグ配列を付加した融合蛋白質を発現する形質転換植物の取得に成功している。初期のコンストラクトでは、植物体内での発現に TMV35S の強力なプロモーターを使用していたため、過剰に発現し、精製標品にアセンブリーの不十分な複合体が多量に混入してくるという問題点があった。

今回使用する形質転換植物は、それ自身のプロモーターを使用する事により発現量が厳密にコントロールされるように改良してある。この形質転換植物を利用することで、TIC 複合体および輸送モーター複合体、およびこれらが結合した超分子複合体の精

製条件の検討を行う。さらにこの形質転換植物の栽培スケールを5~10倍に増やし、さらにアフィニティークロマトグラフィによる精製条件(界面活性剤、塩濃度、アフィニティ樹脂等)に改良を加える事で、最終的にmgオーダーで精製複合体を得る事を目指す。

4. 研究成果

これまでに、精製のためのトランスジェニック植物の栽培方法、葉破碎方法、葉緑体膜調整方法、可溶化のためのデタージェントの種類、デタージェントの濃度の検討、可溶化の際の塩濃度の影響、を詳細に検討した。また可溶化後の条件検討としては、様々なアフィニティ樹脂の種類、量の検討、また、アフィニティ樹脂に結合させる際の塩濃度、温度、時間、バッファの種類等の諸条件の詳細な検討を行った。基本的に、非常に高い精製度で精製できる事に成功している。今後は、精製標品を用いた機能解析が飛躍的に進むと期待できる。

一方で、構造解析に必要なmgオーダーの精製標品を得るには、精製過程のスケールアップに加えて、精製効率のさらなる最適化が必要であり、今後の課題である。また、スケールアップの際のコストパフォーマンスを考えると、より安価にスケールアップできる系に移行する必要も出てくる。その際、業者から購入するアフィニティ樹脂が最も費用がかかる事から、アフィニティ樹脂を自前で作成できる系に移行する可能性も考える。また、一般に、精製度の高いアフィニティ樹脂からの溶出は、競合ペプチドであったり、部位特異的消化酵素であったりするが、これらも、コストのかかるものである。これらについても、自前で調製できるものに移行していく必要があると考えている。これらについても、今後の課題としたい。

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)

*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.

*Nakai M. YCF1: A Green TIC **Plant Cell.** 2015; July:27(7):1834-8.

*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.

[学会発表](計10件)

Nakai M. The chloroplast protein import system: Evolution and mechanisms. **Gordon Research Conference: Mitochondria & Chloroplast** 2016年6月19日 アメリカ(Mount Snow)

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)

中井 正人. Chloroplast protein import motor has evolved from a membrane-bound AAA protease. **第39回 日本分子生物学会シンポジウム “ほどく、ひきぬく、歩く: AAA+ ATPase の作動原理”** 2016年12月1日 横浜

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)

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)

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.

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.

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.

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.

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.

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

()