

酵母ミトコンドリアを巡るプロテインフラックス

●遠藤斗志也¹⁾ ◆吉久 徹²⁾ ◆西川周一¹⁾

1) 名古屋大学大学院理学研究科 2) 名古屋大学物質科学国際研究センター

〈研究の目的と進め方〉

ゲノムプロジェクトに基づき、細胞機能を「細胞を構成する全タンパク質の機能の集合」として理解するためには、細胞構造の階層性という視点が不可欠である。本研究では細胞内構造として出芽酵母ミトコンドリアをとりあげる。ミトコンドリアタンパク質はサイトゾルで合成された後、外膜のTOM、内膜のTIMの働きでミトコンドリアに取り込まれ、適切なミトコンドリア内区画に配置される。取り込まれたタンパク質はミトコンドリア内シャペロンHsp70、Hsp60の働きで機能化する。これらのプロセスの全体像を、全ミトコンドリアタンパク質の流れ（プロテインフラックス）として網羅的に解析し、フラックスの大きさと分岐を制御する因子とメカニズムの解明の突破口を開くことをめざす。このような視点に立った研究はまだどこでも行われていず、オルガネラゲノム学というべき新分野の創出につながると考えられる。

〈研究開始時の研究計画〉

【12年度】

ミトコンドリアタンパク質はサイトゾルで合成された後、外膜のTOM、内膜のTIMの働きでミトコンドリアに取り込まれ、適切なミトコンドリア内区画に配置される。取り込まれたタンパク質はミトコンドリア内シャペロンHsp70、Hsp60の働きで機能化する。これらのプロセスの全体像を、全ミトコンドリアタンパク質の流れ（プロテインフラックス）として網羅的に解析し、フラックスの大きさと分岐を制御する因子とメカニズムの解明の突破口を開くことをめざす。

【13年度】

- (1) 酵母より単離した高純度ミトコンドリアを分画して二次元電気泳動で展開、限定分解と質量スペクトル測定により主要スポットのタンパク質同定を行う。機能未知のミトコンドリアタンパク質の同定をめざすとともに、(3)の実験のための基礎データとする。
- (2) 酵母ミトコンドリアの内在性膜タンパク質について、限定分解と質量スペクトル測定によりタンパク質同定を行う。機能未知のミトコンドリアタンパク質の同定をめざす。
- (3) 酵母細胞から全mRNAを単離、35S-Met存在下、ウサギ網状赤血球ライセートの無細胞翻訳系により翻訳する。翻訳産物を基質として、in vitroで単離ミトコンドリアへの取り込み実験を行う。

〈研究期間の成果〉

【12年度】

- (1) 酵母細胞からNycodenz密度勾配遠心を用いて高純度のミトコンドリアを単離精製し、可溶性膜間部、塩溶性膜間部、マトリクス、膜画分に分画する方法を確立した。
- (2) 分画したミトコンドリアの各画分について二次元電気泳動を行い、CBB染色した各スポットを限定分解

→MS測定による同定を開始

- (3) 酵母細胞から全mRNAを単離、in vitroで翻訳しRI標識タンパク質を合成した。これを基質として、in vitroで単離ミトコンドリアへの取り込み実験を行い、ミトコンドリアを回収して二次元電気泳動を行った。

【13年度】

- (1) 酵母細胞からNycodenz密度勾配遠心を用いて高純度のミトコンドリアを単離精製した。マトリクス画分について二次元電気泳動を行い、CBB染色した各スポットを限定分解→質量スペクトルで同定した。(マトリクス画分の二次元電気泳動で84個のスポットが得られ、そのうち48個のスポットを44種類の酵母タンパク質に同定できた。このうち4種類が機能未知の酵母タンパク質であった。)
- (2) 単離ミトコンドリアの内在性膜タンパク質画分については、一次元電気泳動後、二次目に展開せずに、限定分解とMS-MS測定によりタンパク質同定を行った。(20本のバンドのうち10本のバンドを12種の酵母タンパク質に対応づけることができた。このうち1種類が機能未知の酵母タンパク質であった。)
- (3) 酵母細胞から全mRNAを単離、in vitroで翻訳しRI標識タンパク質を合成した。これを基質として、in vitroで単離ミトコンドリアへの取り込み実験を行い、プロテアーゼでミトコンドリア内に取り込まれなかったタンパク質を消化した場合としない場合の各々について、ミトコンドリアを回収して二次元電気泳動を行い、標識タンパク質のスポットを検出した。
- (4) (3)の実験を受容体Tom70の欠損株について行うことにより、Tom70に依存してミトコンドリアに取り込まれるタンパク質を網羅的に解析するために、受容体への結合が律速段階となるようなin vitroインポートの実験条件を確立した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ミトコンドリアへのタンパク質移行に関しては、Neupert (独)、Pfanner (独)、三原 (日本)、森 (日本)らが解析を進めているが、プロテオームの視点に立って、移行の基質の全体像を捉えようとする研究は当時行われていなかった。その後、ミトコンドリアタンパク質のプロテオーム解析は幾つか行われたが、タンパク質のミトコンドリア移行をプロテオームワイドで行った研究は報告されていない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当時の問題点としては、アフィニティタグを用いたミトコンドリアの精製は非特異的吸着が障害となり難航、二次元電気泳動で得られるスポットの絶対数が十分でない、といったことがあった。

〈今後の課題〉

目標

- 1) ミトコンドリアの外膜と膜間部のタンパク質については全タンパク質の同定をめざす。マトリクスと内膜のタンパク質については、主要タンパク質の同定と、各種変異体において影響の現れたタンパク質の同定を優先的に行う。
- 2) ミトコンドリア移行がTom20, Tom70の機能に依存するタンパク質と高温耐性がHsp60に依存するタンパク質をできるだけ多く同定する。

具体的な研究計画

- 1) ミトコンドリアの各画分のタンパク質を二次元電気泳動で展開し、限定分解とMS測定により主要スポットのタンパク質同定を行う。一次元電気泳動後、二次元目に展開せずに、限定分解とMS-MS測定によりタンパク質同定を行うことも検討する。
- 2) 酵母細胞から全mRNAを単離、35S-Metでラベルした翻訳産物を基質として、*in vitro*で単離ミトコンドリアへの取り込み実験を行う。ミトコンドリアに取り込まれたタンパク質を二次元電気泳動で展開し、Tom20の欠損株、Tom70の欠損株で取り込みに影響の現れたスポットを検出し、対応する2-1)のスポットをMS測定により同定する。Hsp60の変異株については、ミトコンドリアに取り込み後、非許容温度にシフトし、凝集したタンパク質をミトコンドリアの可溶化、遠心により沈殿させる。Hsp60の機能欠損特異的に凝集するタンパク質を、二次元電気泳動で検出→対応する2-1)のスポットをMS測定で同定する。

特に力を注ぐべき点、困難が予想される点。

- 1) で、Tom20, Tom70, Hsp60機能欠損により影響を受けたスポットを正しく評価することが最も重要かつ難しいと思われる。

現時点(当時)では、ミトコンドリアタンパク質の同定数が十分ではない。タンパク質の絶対量の不足が一つの理由であり、今後実験のスケールアップにより、同定タンパク質数のかなりの増加が可能と考えられる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. T. Endo and D. Kohda:
Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import (Review article).
Biochim. Biophys. Acta 1592, 3-14 (2002)
2. H. Yamamoto, M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo :
Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes
Cell 111, 519-528 (2002)
3. T. Endo
Mitochondrial protein flux
in *Genome Science - Towards a New paradigm?*
(eds. H. Yoshikawa, N. Ogasawara, and N. Satoh) pp27-32, Elsevier Science, Amsterdam (2002)
4. T. Endo, H. Yamamoto, and M. Esaki
Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. (Commentary Article)
J. Cell Science 116. 3259-67 (2003)
5. 遠藤斗志也, 江崎雅俊, 山本 林, 吉久 徹

ミトコンドリアをめぐるタンパク質フラックス

- 実験医学増刊「細胞内輸送研究の最前線」21, 1889-1895 (2003)
6. M. Esaki, T. Kanamori, S. Nishikawa, I. Shin, P. G. Schultz, and T. Endo
Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation
Nature Struct. Biol. 10, 988-994 (2003)
 7. M. Esaki, H. Shimizu, T. Ono, H. Yamamoto, T. Kanamori, S. Nishikawa, and T. Endo
Mitochondrial protein import: Requirement of the presequence elements and TOM components for precursor binding to the TOM complex
J. Biol. Chem. 279, 45701-45707 (2004)
 8. 遠藤斗志也, 吉久 徹
総論 蛋白質の移動(真核生物): 細胞内の交通管制システムがはたらく仕組み
蛋白質核酸酵素増刊「細胞における蛋白質の一生」49, 877-888 (2004)
 9. M. Naoe, Y. Ohwa, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and T. Endo
Identification of Tim40 that mediates protein sorting to the mitochondrial intermembrane space
J. Biol. Chem. 279, 47815-47821 (2004)
 10. H. Yamamoto, T. Momose, Y. Yatsukawa, C. Ohshima, D. Ishikawa, T. Sato, Y. Tamura, Y. Ohwa and T. Endo
Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane.
FEBS Lett. 579, 507-511 (2005)
 11. K. Yamano, D. Ishikawa, M. Esaki, and T. Endo
Phosphate carrier has an ability to be sorted to either the TIM22 pathway or TIM23 pathway for its import into yeast mitochondria.
J. Biol. Chem. 280, 10011-10017(2005)