

酵母ミトコンドリアを巡るプロテインフラックス

●吉久 徹¹⁾ ◆遠藤斗志也²⁾ ◆西川周一²⁾

1) 名古屋大学物質科学国際研究センター 2) 名古屋大学大学院理学研究科

〈研究の目的と進め方〉

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為には、細胞がオルガネラという機能区画に分けられ、それらが調和しつつ機能するという視点が必要である。呼吸等を担うミトコンドリアのタンパク質の多くは核の染色体上にコードされており、サイトゾルで合成された後、外膜の膜透過装置TOM、内膜の膜透過装置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の働きで機能化する。こうしたタンパク質の輸送経路は、今まで、限られたモデルタンパク質を基質として解析されてきた。しかし、かぎられた基質を用いた解析でも、こうした経路には複数のタンパク質の流れ〈フラックス〉が存在し、それらが協調してミトコンドリアへのタンパク質の機能を担う可能性が指摘されてきた。我々は、既に明らかにされたゲノム情報を利用しつつ、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〈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をめざす。特に、膜透過装置の要求性でこのフラックスが分岐することに着目し、こうした因子の変異株より調製したミトコンドリアを用いたin vitro系での研究を展開する。本研究は、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ともに、ミトコンドリアの新機能の発見にもつながると考えられる。

〈研究開始時の研究計画〉

【14年度】

ミトコンドリア外膜上でのフラックス分岐の解析システムを完成し、Tom70依存等の経路について実際のデータ収集を完了する。

- 1) 高度精製ミトコンドリア画分中のマトリックスタンパク質、内在性膜タンパク質について同定を進め、基礎データとなる2D Gelマップ等を充実させる。
- 2) Tom70欠失ミトコンドリアを用いたフラックス分岐の解析を進める。
- 3) マトリックスシャペロンのタンパク質フォールディングに関するフラックス解析の実験条件検討に入る。

【15年度】

- 1) 平成14年度に引き続き、ミトコンドリアに含まれる全タンパク質の同定を進める。
- 2) 外膜レセプターレベルでのミトコンドリアタンパク質フラックスの分岐の全体像を明らかにするため、複数のレセプターの一つを遺伝子レベルで欠失した変異体を用いて、in vitroで全mRNA翻訳産物のミトコンドリアへの取り込み実験を行い、影響を受けたタンパク質を同定する。
- 3) 内膜膜透過装置構成因子tim23温度感受性変異株、およびtim54温度感受性株等から調製したミトコンドリアを用い、(2) 同様の解析を行う。

【16年度】

- 1) ミトコンドリアタンパク質フラックスのTom70依存性特性の検討を行う。2次元電気泳動上で解析されたミトコンドリア前駆体タンパク質について、プレ配列のみをDHFRに、また、成熟体部分のみをTom70依存または非依存のプレ配列に融合し、Tom70の依存性はプレ配列、成熟体いずれに起因するかを網羅的に解析する。
- 2) 新規ミトコンドリアプロテインフラックス関連因子のゲノムワイドな検索を試みる。既知の多くのミトコンドリアフラックス関連因子が酵母に取って必須であることを念頭に、酵母ゲノム上機能未知のORF中、生育に必須かつ生物種間で保存されたORFのうち38を選び、全てに関してin vitroミトコンドリア取り込み実験、タグ融合株の構築からミトコンドリアタンパク質を抽出する。これらのシャットオフ株の解析から、新規フラックス関連因子を同定する。
- 3) ミトコンドリア2次元電気泳動データベースを構築する。昨年度から引き続き、2次元電気泳動マップを整備し、これに基づいた酵母ミトコンドリアタンパク質データベースを構築、Web上での公開を目指す。

〈研究期間の成果〉

【14年度】

- 1) 精製したミトコンドリアを複数の条件下で2D Gel電気泳動し、解析可能な506のタンパク質スポットを得た。このうち、既に166のスポットについて90種類のタンパク質に帰属することができた。この内、65種類のタンパク質は、ミトコンドリアマトリックスタンパク質に特徴的な、プレ配列を有するタンパク質であった。現在、2D Gelマップデータベースを作成中であり、Web上での公開を視野に入れて、整備を進めている。
- 2) シグナル受容体の一つであるTom70を欠失したミトコンドリアへの網羅的な取り込み実験を行った。全酵母mRNA由来の翻訳産物を野生型またはTom70欠失型ミトコンドリアに取り込ませ、2D Gelで展開して得られた117のスポットについて定量的比較を行った。その結果、13のスポットでは、明らかにTom70欠失ミトコンドリアでの取り込みが低下していた。
- 3) この内5種類については帰属ができ、いずれもプレ配列を持つタイプの前駆体であることが明らかとなった。同じような特性を持ったプレ配列でありながら、受容体を使い分けて輸送されているミトコンドリアへのタンパク質フラックスの実態が明らかとなった。

【15年度】

- 1) 昨年度に引き続き、ミトコンドリア2次元電気泳動データベース構築のための基礎データ収集を進めた。
- 2) 昨年度、酵母全mRNA翻訳産物を基質とし、2D Gelで解析することでミトコンドリアに取り込まれることが明らかとなった15種類のミトコンドリアタンパク質について、外膜受容体Tom70の依存性を個別の取り込み実験により定量的に解析した。これによって、今までの予想と異なり、Tom70への依存性がall-or-noneではなく、量的なものである

ことが明らかとなった。

- 3) ミトコンドリアタンパク質の内、少なくとも3種類はその取り込みがTom70の欠失で上昇することが分かった。
- 4) 核にコードされたtRNAのsplicingに関わるendonucleaseがミトコンドリア外膜に局在することが明らかとなった。

【16年度】

- 1) 幾つかのTom70依存性前駆体タンパク質のプレ配列部分や数十残基の成熟体領域を含むN-末端はDHFRをミトコンドリアへの運び込むことができず、これらの前駆体は、成熟体部分にプレ配列と協調して働く内在性のシグナルがある可能性が示された。また、プレ配列部分が融合されたDHFR部分の膜透過を引き起こす活性を持つ場合でも、その取り込みがTom70に依存しなくなる例が見つかった。こうしたことは、Tom70依存性でかつプレ配列を持つ前駆体の中には、やはり、成熟体部分でTOM複合体のシグナル受容体部分と相互作用するものがあることを示している。ミトコンドリア局在化シグナルの、新たな多様性が明らかとなった。
- 2) ゲノム情報を利用したin silicoスクリーニングと、in vivoの膜透過異常検出スクリーニングを組み合わせて、複数の新規膜透過関連因子を同定した。そのうち、二つのミトコンドリア外膜タンパク質Tom13、Tom38は、ミトコンドリア外膜に特有の β バレル型膜タンパク質の膜挿入・複合体形成に関与する因子であること、特にTom38はSAM複合体構成因子であることを明らかにした。
- 3) 引き続き、2次元電気泳動マップをベースにしたミトコンドリアデータベースを整備し、スタンダードを用いた可能なデータベースMito2Dを構築した。現在、これをWeb公開するために移植作業を実施中である。

〈国内外での成果の位置づけ〉

オルガネラ構成タンパク質の同定などは、いくつかの研究室で行われており、シロイヌナズナやヒトのミトコンドリアプロテオミクスの報告が報告され始めた。しかし、生合成途上のタンパク質のフラックスをこのような形で網羅的に解析する研究は、極めてユニークである。種間の比較オルガネラプロテオミクスもあわせて展開が可能となった現在、当研究は意義あるものと考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

【14年度】

2D Gel電気泳動を定量的に解析することは、かなりの困難が伴った。これは、1次元目の定量性に由来するものであり、結果として、ゲル上で検出できたスポットの内、様々な、内部・外部標準と比較した上で、定量解析に適したもののみを選別し、定量、解釈した。その結果、当初予定した、ミトコンドリアマトリックスのシャペロンシステムのフラックスへの寄与の解析まで、研究が進展しなかった。

【15年度】

2D Gelによる解析で、ある程度の定量性を持ってミトコンドリアへの取り込みを測定することが可能となったが、厳密な議論をするためには、より定量性の高いデータを得るために個別の前駆体タンパク質を基質とした取り込み解析を行わざるを得ない。結果として、tim変異株を用いた株の解析が十分進んでいない。ある程度多数の基質を用いて、効率よく定量解析を行うシステムを工夫する必要がある

【16年度】

- 1) Tom70受容体が、ミトコンドリア前駆体タンパク質成

熟体部分のどのような特性を認識しているのか、その特性は内在性シグナルを持つことが知られているAACなどの内膜内在性膜タンパク質のシグナルと同じなのかについて、多数の前駆体タンパク質を比較することで明らかにする必要がある。

- 2) 未だ機能解析の進んでいない新規因子に関して解析を進め、膜透過因子側の全体像を明らかにする必要がある。

〈今後の課題〉

【14年度】

- 1) マトリックスシャペロンのタンパク質フォルディングに関するフラックス解析の実験条件検討を行う。
- 2) ミトコンドリアプロテオミクスの展開されている生物種の全mRNA画分を用い、同様な実験を行うことで、フラックスの生物種間での類似または相違点を明らかにする。

【15年度】

受容体の要求性が局在化シグナルであるプレ配列と成熟体部分のどちらの特性に依存するのかについて明らかにする必要がある。

【16年度】

AAA ATPaseやミトコンドリアシャペロンによるタンパク質品質管理機構の網羅的解析に関して、十分に研究を展開できなかった。今後、こちらの解析を進めて行き、プロテインフラックスの最終段階に近い、タンパク質の高次構造形成、品質管理に関する情報を得てゆく必要がある。

3年間にわたり研究を展開し、プロテインフラックス解析(ミトコンドリア2Dゲルデータベース構築やプレ配列受容体フラックス解析の基礎データなど)は予定より多少遅れたものの、その技術的方向性が確立できたと思われる。また、その中からミトコンドリアプレ配列受容体の基質タンパク質選別特性の新たな一面を明らかにできた。現在、成果全体の発表に向けて、残りの実験およびそれらとりまとめを進めているが、こうした変異ミトコンドリアを用いた網羅的なin vitro解析をさらに進めることで、ミトコンドリアにおけるプロテインフラックスの全体像を、より詳細に明らかにしていくことができると思われる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0404082052

Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tananka, N., and Endo, T.

Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. Mol. Biol. Cell 14(8), 3266-3279 (2003)

2. 0403271050

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21(24), 1889-1895 (2003)

3. A. Takano, T. Endo, and T. Yoshihisa

tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. Science 309, 140-142 (2005)

4. 吉久 徹

核細胞質間を行き来するtRNA

蛋白質核酸酵素 51,48-53 (2006)