

真核生物のミトコンドリア形成の分子機構に関する研究

Study on the molecular mechanism of mitochondrial biogenesis

代表研究者 名古屋大学理学部化学教室教授 遠藤 斗志也
Prof., Dept. of Chem., Faculty of Sci., Nagoya Univ.
Toshiya ENDO

Two approaches were used to identify proteins involved in translocation and sorting of proteins in yeast mitochondria. First, translocation intermediate was created by using a fusion protein consisting of a presequence of cytochrome oxidase subunit IV, mouse DHFR, a spacer, and avidin (pCOX IV-DHFR-SP-Avidin). Since avidin moiety forms a stable tetramer in the presence of biotin, the avidin part of the fusion protein cannot move across the mitochondrial membranes while pCOX IV-DHFR-SP part can enter the mitochondrial matrix. We are making a similar translocation intermediate using a derivative of the fusion protein which has an additional protein A moiety at the C-terminus. With this translocation intermediate, we expect that the translocation machinery can be purified by an affinity column for protein A. Second, a screening system was developed for a sorting machinery between the intermembrane space and the matrix inside mitochondria. The gene for a fusion protein consisting of a presequence of cytochrome b_2 (an intermembrane protein) and a mature part of cytochrome oxidase subunit IV, which is integrated into the complex from the matrix side and essential for respiration, was introduced into a COX IV-deficient strain. A multi-copy suppressor gene which restores the respiration ability is being searched for.

研究目的

生物において、個々の分子から分子複合体、細胞内小器官（オルガネラ）、細胞、組織、器官、個体がいかに構築されていくか、その複合化の過程で個々の要素が本来持っていなかった新しい機能がいかにかに発現するかを明らかにすることは、生命科学の最も重要な課題のひとつである。このような生体の構造（形態）形成において、どのような原理が働いているかを理解するためには、各過程に関与する因子を単離、同定し、最終的にはそれらの要素による複合体の再構成を行うことが必要である。本研究では、真核生物のオルガネラ（ここではミトコンドリア）の形成に焦点を絞って、ミトコンドリアへのタンパク質の取り込みと仕分けに関与する因子を単離、同定、キャラクタライズし、再構成への道をひらくことをめざした。

ミトコンドリアは、真核生物の細胞内で、生体の諸活動に必要なエネルギー源である ATP を酸

化的リン酸化によって作り出すオルガネラである。ミトコンドリアは二重の生体膜によって取り囲まれ、外膜、膜間部、内膜、マトリクスの四つの区画が作られている。酸化的リン酸化に関与するタンパク質の大部分は、ミトコンドリアの内膜および膜間部に局在化し、マトリクスにはクエン酸回路をはじめ様々な代謝反応に関与するタンパク質が局在している。ミトコンドリアタンパク質の大部分は核の DNA によりコードされ、細胞質ゾルで前駆体として合成された後、ミトコンドリアの内部に取り込まれる。マトリクスのタンパク質は外膜と内膜を通過して、マトリクスに局在化する。膜間部や内膜のタンパク質は、いったんマトリクスに取り込まれてから、あらためて膜間部側に送り出されるとする conservative sorting 説が有力であったが、最近、外膜を通過した後、内膜を通過せずに膜間部に局在化するとする stop transfer 説を強く支持する報告が出てきて

いる。本研究では、ミトコンドリアタンパク質のマトリクスへの取り込み、膜間部への仕分けに関与する装置の検索を試みた。

研究経過

1. マトリクスへの取り込み装置の検索

タンパク質がミトコンドリアの膜を通過するためには、タンパク質の高次構造がほどけなければならぬという要請がある。そこで、高次構造を安定化することにより、膜透過反応の中間体を作ることができる。本研究では、ミトコンドリアタンパク質前駆体のモデルである pCOX IV-DHFR (ミトコンドリアタンパク質であるシトクロム酸化酵素サブユニット IV のプレ配列にジヒドロ葉酸還元酵素をつないだ融合タンパク質) に、スペーサーを介してアビジンをつないだ融合タンパク質 pCOX IV-DHFR-SP-Avidin を、遺伝子レベルで作製した。当初の計画では、スペーサーまでの融合タンパク質をまず用意し、次に架橋剤でアビジンを繋ぐことを考えていたが、すべて遺伝子レベルで作製する方法に変更した。アビジンは安定な 4 量体を形成するので、膜透過が停止することが期待される。

2. ミトコンドリア内でのタンパク質の仕分けに関与する装置の検索

当初は、conservative sorting 説に基づき、ミトコンドリアのマトリクスから膜間部への送り出しに関与する装置を検索することを計画していた。conservative sorting 説によれば、膜間部のタンパク質はいったんマトリクスに取り込まれた後、ミトコンドリアの祖先の細菌時代の分泌装置を利用して、膜間部に送り出される。そこで、大腸菌の分泌装置を通過できずに膜透過が停止してしまうことが知られている β ガラクトシダーゼに、膜間部行きのシグナルを付けた融合タンパク質 (pC₁-LacZ) を遺伝子レベルで作製し、ガラクトース誘導型のプロモーターにつないで酵母株に導入する。ガラクトースを培地に加えて pC₁-LacZ を大量に発現させると、大腸菌の場合と同様、マトリクスから膜間部への送り出しの段階で膜透過が停止することが期待される。この膜透過停止を阻害するような突然変異体を選別しよ

うというのが、最初の計画であった。しかし予備実験により、pC₁-LacZ を酵母細胞内で大量発現させることが困難であることが分かり (理由は不明)、さらに最初に述べたように conservative sorting 説そのものに疑問が出てきた。そこで膜間部への仕分けのメカニズムに依存しない、仕分け装置の機能に関する突然変異体選別の方法を考案した。

シトクロム酸化酵素サブユニット IV (COX IV) は、ミトコンドリアのマトリクス側から内膜のシトクロム酸化酵素複合体に組み込まれるタンパク質で、ミトコンドリアの呼吸機能に必須である。そこで、COX IV の遺伝子を相同組み替えにより破壊し、COX IV 欠損株を作製する。この株は、呼吸機能が欠損しているため、呼吸基質であるグリセロール培地では生育できない。次に、膜間部行きのシグナル (シトクロム b₂ のプレ配列) を COX IV につないだ融合タンパク質 (pb₂-COX IV) の遺伝子を、この酵母株に導入する。pb₂-COX IV は、膜間部に局在化するため、シトクロム酸化酵素複合体に組み込まれることができず、したがって呼吸機能は回復しない。ここで呼吸機能を回復するような (グリセロール培地で生育できるような) 変異株を選別する。このような変異株には、導入遺伝子の pb₂-COX IV のシグナル部分が変化して、マトリクスに局在化しようになったもの (plasmid-link の変異) と、ミトコンドリア内の仕分け装置の変異が生じて膜間部に行くべきタンパク質の一部が誤ってマトリクスに仕分けられてしまう (その結果 pb₂-COX IV の一部がマトリクスに局在化する) ような変異 (host-link の変異) が含まれるはずである。

研究成果

1. マトリクスへの取り込み装置の検索

pCOX IV-DHFR-SP-Avidin をウサギ網状赤血球ライセートを用いた無細胞タンパク質合成系 (³⁵S-Met が共存) で翻訳し、放射性同位元素標識されたタンパク質を作った。これを用いて、酵母より単離したミトコンドリアへの *in vitro* での取り込み実験を行った。すなわち翻訳産物をミトコンドリアとインキュベートし、遠心によりミトコ

ンドリアを回収，ミトコンドリアと共に回収されたタンパク質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動とオートラジオグラフィにより，分析した。ミトコンドリアとインキュベートすると，融合タンパク質 pCOX IV-DHFR-SP-Avidin は分子量がプレ配列に対応する分だけ減少した。タンパク質のアミノ末端がミトコンドリアのマトリクスに達し，マトリクスの酵素によってプレ配列が切断されたと考えられる。タンパク質分解酵素であるプロテイナーゼ K をミトコンドリアの外から加えると，ミトコンドリアとともに回収された融合タンパク質の半分は，分子量が減少して COX IV-SP に対応する大きさになった。融合タンパク質のアビジン部分がミトコンドリアの外にあったため，プロテイナーゼ K で消化されたものと考えられる。したがって，この融合タンパク質の半分はミトコンドリア内部に取り込まれるものの，残り半分はアビジン部分が外膜を通過できずに，ミトコンドリアの 2 枚の生体膜を貫通した形で膜透過反応の中間体となったと考えられる。しかし，以上の結果を再現性よく得るためには，翻訳時に反応液にアビジン部分に対するリガンドであるビオチンを共存させることが必要であった。ビオチンがアビジンに結合することにより，4 量体形成を促進するものと思われる。

当初は，膜透過反応の中間体を，相互作用しているであろう膜透過装置ごと可溶化し，ビオチンのアフィニティカラムで精製することを考えていた。しかし，翻訳時にビオチンを共存させて作った融合タンパク質にはすでにビオチンが結合しているため，ビオチンのアフィニティカラムをさらに精製の目的で使うことはできない。そこで，現在アビジンの後にさらにプロテイン A を繋いだ融合タンパク質 (IgG のアフィニティカラムで精製可能) を用いて，同様の実験を行っているところである。

2. ミトコンドリア内でのタンパク質の仕分けに関与する装置の検索

まず，COX IV 欠損株を作製した。この酵母株は呼吸基質であるグリセロールを含む培地上では生育できなかった。この株に COX IV 遺伝子を再

導入すると，グリセロール培地上で生育できるようになったが，pb₂-COX IV 遺伝子を導入してもグリセロール培地で生育はできなかった。COX IV に対する抗体を用いたブロットニングにより，pb₂-COX IV 遺伝子導入株では確かに pb₂-COX IV が発現し，発現産物の一部はミトコンドリア内膜で停止した形となり，残りは膜間部に局在化していることが確認された。次にこの形質転換株を変異剤処理し，グリセロール培地で生育できるコロニーを 2000 株を選別した。ミトコンドリアの膜間部とマトリクスの間での仕分けをつかさどる装置は，酵母の生存に必須であると考えられるので，さらにこれらの株について温度致死性変異となる (30°C では生育できるが，37°C では生育できない) 株を 53 株選別した。これらについて，pb₂-COX IV 遺伝子を取り除き，もう一度 pb₂-COX IV 遺伝子を導入しなおしたところ，すべて呼吸機能欠損となった。このことは，仕分けの誤りがすべて pb₂-COX IV の局在化シグナルの変異に基づいている (plasmid-link) ことを示している。すなわち，この系では，host-link の変異に比べて plasmid-link の変異が生じる確率が圧倒的に高いと考えられる。そこで，発想を変え，pb₂-COX IV 遺伝子導入株に，野生型株の遺伝子断片を multi-copy のプラスミドに入れた形で導入し，multi-copy suppressor として呼吸機能を回復する遺伝子断片を検索することとした。現在，このような遺伝子断片を検索中である。

今後の課題と発展

本研究では，ミトコンドリアタンパク質の局在化に関与する装置を二つの方法で検索することを試みた。いずれの方法も，最初の計画を修正することが不可欠であった。現在，そのような装置の同定に向けて実験が進行中であるが，最終的な同定にいたるには，あと 1 年くらい必要であると考えられる。いずれの装置も，同定されれば，その遺伝子の構造決定，機能の解析など，新しい課題が次ぎつぎに控えており，大きな発展が期待される。

謝辞 本研究は，日産学術研究助成による援助を受けて行われました。厚くお礼申し上げます。