

提出日:2022 年 5 月 6 日

2021 年度 Bio-SPM 技術共同研究事業

研究成果の概要

実験課題名		動作中のミトコンドリア膜透過装置 TOM 複合体を通過する前駆体タンパク質の動態解析	
申請者 (実験責任者)	氏名	荒磯 裕平	
	所属機関名・部局名	金沢大学 医薬保健研究域 保健学系	
	職名	助教	
利用した Bio-SPM 技術 (該当の技術の右欄に○)			超解像 AFM(FM-AFM 及び、3D-AFM)
		○	高速 AFM
			SICM
NanoLSI 受入担当教員名		古寺 哲幸	
<p>TOM(Translocase of the outer mitochondrial membrane)複合体はミトコンドリア外膜に局在するヘテロ膜タンパク質複合体で、サイトゾルで合成されたミトコンドリアタンパク質の殆どは TOM 複合体によってミトコンドリア内部へと取り込まれる。TOM 複合体は、β バレル型チャネル Tom40、および1回膜貫通ヘリックスを有する6つのサブユニットから構成される。TOM 複合体は3つの Tom40 チャネルを含む三量体として機能することが示唆されてきたが、近年のクライオ電子顕微鏡解析では2つの Tom40 チャネルを含む二量体構造が決定された。すなわち、ミトコンドリア膜上の TOM 複合体は複数のアッセンブリー状態の動的平衡にあり、異なるアッセンブリー状態を行き来する構造変換メカニズムの存在が考えられる。本研究では、高速原子間力顕微鏡(HS-AFM)解析によって 100 ミリ秒の時間分解能とナノメートルの空間分解能にて TOM 複合体の動的構造解析を行い、1分子の TOM 複合体が三量体と二量体を行き来する瞬間や、前駆体ミトコンドリアタンパク質を取り込む様子を可視化することで、TOM 複合体の動作メカニズムを解明することを目的とする。</p> <p>現在までに、界面活性剤を含む溶液中において TOM 複合体の分子動態を観察することに成功し、タンパク質透過チャネルを2つ有する二量体構造や、3つのチャネルが三角形状に会合した三量体構造の分子動態を捉えることができた。TOM 複合体を構成する各単量体の高さを測定したところ、三量体は幾何学的な対称性を持った構造をとらないことが明らかになり、安定な二量体構造に不安定な単量体が結合した特徴的な会合状態をとっていることが推測された。さらに、生体内に近い状態での分子動態を解明するため、脂質二重膜ナノディスクを用いた分子動態解析にも取り組み、脂質二重膜中においても TOM 複合体の三量体構造を捉えることに成功した。今後は、受容体サブユニットの可溶性領域に GFP タグを導入した TOM 複合体を複数種類調製し、GFP を目印とした"GFP トラッキング法"によって受容体サブユニットの空間配置を決定する。さらに HS-AFM 観察中の TOM 複合体に様々な基質タンパク質を添加し、TOM 複合体が受容体サブユニットを介してタンパク質を認識し、チャネル内部に取り込む様子を可視化する。ここまでの解析によって、"動作中の" TOM 複合体によるタンパク質輸送機構を解明し、ミトコンドリア生合成機構の一端を明らかにする。</p>			

※本様式 3 は、「事業成果報告」として、ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限:2022 年 5 月 6 日(金) ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先:金沢大学 WPI-NanoLSI Bio-SPM 技術共同研究事業担当係 E-mail: Bio-spmscr_nano@ml.kanazawa-u.ac.jp