

MICOS 複合体構成因子の
ミトコンドリアへの輸送機構の解析

植田 依里

本学位論文中の一部の図等は、下記の論文において公表している。

Ueda E, Tamura Y, Sakaue H, Kawano S, Kakuta C, Matsumoto S, Endo T.

Myristoyl group-aided protein import into the mitochondrial
intermembrane space.

Sci Rep. 2019 Feb 4;9(1):1185. doi: 10.1038/s41598-018-38016-1.

目次

1. 緒言

2. 材料と方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 酵母株

2-1-2. 大腸菌

2-1-3. オリゴヌクレオチドプライマーおよびプラスミド

2-1-4. 抗血清および抗体

2-2. 実験方法

2-2-1. 遺伝子操作

2-2-2. 酵母からの DNA の回収

2-2-3. プラスミドの構築

2-2-4. 酵母株の作製

a. *Mic19Δ* 株の作製

b. *mia40-FLAG* 株の作製

c. 酵母株へのプラスミドの導入

2-2-5. 抗原タンパク質の調製

a. *Mic60*(83-540) の調製

b. MBP-*Mic12* の調製

2-2-6. ウサギへの免疫

a. 抗原の調整

b. ウサギへの免疫

2-2-7. 膜分画

2-2-8. 酵母からのミトコンドリアの単離

2-2-9. ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* タンパク質合成

a. 単離ミトコンドリアへのタンパク質取り込み実験

b. *in vitro* ミリスチル化検定

2-2-10. 単離ミトコンドリアへの前駆体タンパク質取り込み実験

2-2-11. TCA 沈殿による可溶性タンパク質の回収

2-2-12. アルカリ抽出による局在化解析

2-2-13. 単離ミトコンドリアを用いた共免疫沈降実験

- a. SDS-PAGE を用いた解析のためのサンプル調整
- b. 二次元電気泳動を用いた解析のためのサンプル調整

2-2-14. Mia40-FLAG と Mic19C146S/C157S との共免疫沈降実験

2-2-16. SDS-PAGE

2-2-17. Blue native electrophoresis (BNE)

2-2-18. タンパク質の検出

- a. ウェスタンブロッティング
- b. ラジオイメージング

3. 結果

3.1 MICOS 複合体構成因子の外膜通過後のミトコンドリアの各区画への輸送機構の検討

- 3.1.1 内膜に局在する MICOS 複合体構成因子の輸送は膜電位に依存する.
- 3.1.2 MICOS 複合体構成因子の輸送は TIM22 複合体には依存しない
- 3.1.3 内膜に局在する MICOS 複合体構成因子の輸送は TIM23 複合体に依存する.
- 3.1.4 MICOS 複合体構成因子の輸送は SSC1 には依存しない
- 3.1.5 Mic19 の輸送は Mia40/Tim40 に依存する.
- 3.1.6 Mic19 の輸送は還元剤であるジチオスレイトール (DTT) により阻害される.
- 3.1.7 Mic19 の輸送には自身のもつシステインが関与する.
- 3.1.8 Mic19 は輸送途中に 157 番目のシステインで Mia40 と分子間ジスルフィド結合を形成する

3.2 Mic19 の輸送に関与するミトコンドリア膜透過装置の探索

- 3.2.1 Mic19 のミトコンドリア内への輸送には TOM 複合体のレセプターである Tom20 が関与する
- 3.2.2 Mic19 のミトコンドリアへの輸送に SAM 複合体は影響を与える

3.3 Mic19 の N-ミリストイル化モチーフが輸送シグナルとして働くかについての検定

- 3.3.1 *in vitro* タンパク質合成実験によるミリストイル化の検討
- 3.3.2 Mic19 の N-ミリストイル化モチーフ変異体を用いた
in vitro タンパク質取り込み実験
- 3.3.3 *in vivo* での Mic19 の輸送シグナル解析
- 3.3.4 Mic19 と Tom20 との結合実験
- 3.3.5 Mic19 と Sam50 との結合実験

3.4 N-ミリストイル化モチーフが輸送シグナルとして働く条件の探索

3.4.1 N-ミリストイル化モチーフを持つ Mdm35 の *in vitro* タンパク質取り込み実験

3.4.2 Tim9 に Mic19 の DUF ドメインを付加した融合タンパク質の
in vitro タンパク質取り込み実験.

3.4.3 Tim9 の N 端に構造を持たない配列を付加した融合タンパク質の
in vitro タンパク質取り込み実験.

3.5 Mic19 と Sam50 の相互作用とその意義について

3.5.1 局在化解析

3.5.2 複合体解析

4. 考察

4.1 MICOS 複合体構成因子のミトコンドリアへの輸送機構

4.2 Mic19 のシステインを介した輸送機構

4.3 Mic19 の N-ミリストイル化モチーフを介した輸送機構

4.4 Mic19 のシステインと N-ミリストイル化モチーフの役割について

5. 謝辞

6. 参考文献

7. 略語

1. 緒言

ミトコンドリアは、好気呼吸によるエネルギー産生などの重要な役割を担う、真核生物細胞に必須の細胞小器官（オルガネラ）である。ミトコンドリアは、外膜と内膜の2枚の脂質二重膜、外膜と内膜間の空間としての膜間部、内膜に囲まれたマトリクスの4つの区画からなる。この4つの区画には、それぞれ固有のタンパク質が局在し、機能的な役割分担を担っている。たとえば外膜には、ポリン (porin) と呼ばれる小分子輸送タンパク質が存在し、ミトコンドリア内への、あるいはミトコンドリア内からの分子量数千以下の小分子の輸送を可能にしている。内膜には呼吸鎖複合体と ATP シンターゼが存在し、好気呼吸による ATP 産生を担っている。マトリクスのタンパク質はクエン酸回路の諸反応やミトコンドリア DNA に基づくタンパク質合成など、様々な機能を担う。

内膜は、外膜と接した inner boundary membrane (IBM) と、マトリクスに向かって内膜が陥入したクリステ膜の2つの領域からなる (図 1 A)。IBM とクリステ膜の境界は、クリステジャンクション (CJ) と呼ばれる非常に狭いチューブ構造を形成している。CJ は 1997 年に Perkins らによって電子顕微鏡で観察されていたが[1]，その形成メカニズムは不明であった。しかし近年、CJ の形成に、ミトコンドリア内膜に存在する mitochondrial contact site (MICOS) 複合体が関与することが示された [2-5]。

MICOS 複合体は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、ミトコンドリア内膜の内在性膜タンパク質 Mic10, Mic12, Mic27, Mic26, Mic60, 表在性内膜タンパク質の Mic19 から構成される (図 1 B)。MICOS 複合体は高等真核生物にも保存されているが、ヒトなどの哺乳動物では、Mic25 などのサブユニットがさらに加わっている。酵母の MICOS 複合体は、Mic10-Mic12-Mic27-Mic26 と、Mic60-Mic19 の2つのサブ複合体に分けられる。後者は CJ 形成だけでなく、Sam50 や Por1 などの外膜タンパク質と相互作用することで、内膜と外膜との近接部位（コンタクトサイト）を形成する可能性が示唆されている。MICOS 複合体を構成する因子のうち、CJ の形成に必須のものは Mic10 と Mic60 であり、それぞれの単独欠損株では CJ が正常に形成されない [5]。また、*in vitro* での再構成実験により Mic10, Mic60 はホモオリゴマーを作り、膜の形を変えることが示されている [6-9]。Mic10 については、曲率の高いクリステ膜先端部形成に重要な ATP 合成酵素の二量体化の調節を行うという報告もされている [10]。一方、Mic12, Mic19, Mic27 は直接的に膜の形を変えるという報告はないものの、その欠損株ではミトコンドリア CJ の数が減少する [5]。Mic12 や Mic19 は、2つのサブ複合体間を結合する役割を持ち、CJ の数の調節を行うことが示唆されている [9,11-13]。また Mic27 は、Mic10-Mic12-Mic27-Mic26 サブ複合体の安定性を高めることが報告されている [13]。

MICOS 複合体は、サブ複合体同士が巨大な MICOS 複合体を形成することで CJ を形成するだけでなく、他のタンパク質と相互作用することで CJ 形成以外の役割を持つ可能性も考えられている。上述のように Mic60 と Mic19 はそれぞれ、外膜の SAM 複合体と相互作用することで、外膜と内膜のコンタクトサイトを形成し、タンパク質や小分子の外膜透過と内膜透過を共役させ

る可能性が考えられている [14,15]. さらに外膜で β バレル型膜タンパク質のアセンブリーに関わる SAM 複合体の中心サブユニット Sam50 のノックダウンを哺乳動物細胞で行うと、ミトコンドリア内で合成され、ミトコンドリア機能に重要なリン脂質、カルジオリピンの減少が見られることから、MICOS 複合体が脂質合成と関係する可能性も示唆されている [15]. また、ミトコンドリア内膜の呼吸鎖複合体 IV の構成因子との相互作用が、Mic60 ではみられず、Mic19 や SAM 複合体のみで見られることから、Mic19-SAM 複合体が呼吸鎖複合体の調節に関与する可能性も考えられている [15,16]. しかし、MICOS 複合体のどのサブ複合体がどのタンパク質と直接相互作用するのか、その結果どのような機能を担うのか、さらにはこうした相互作用の調節機構はどうなっているの等、多くの問題が未解明のまま残っている.

MICOS 複合体の構成因子は、ほとんどのミトコンドリアタンパク質と同様に、核 DNA にコードされている. すなわち MICOS 複合体の構成因子はサイトゾルで合成された後に、あるいは合成途中にミトコンドリアへと運ばれる. サイトゾルで合成されたミトコンドリアタンパク質は、膜透過装置 (トランスロケータ) と呼ばれるタンパク質複合体により、ミトコンドリア行きシグナルが認識されて、ミトコンドリア内に取り込まれる [17-19]. 膜透過装置には、ほとんどのミトコンドリアタンパク質の入り口として機能する、外膜トランスロケータの TOM 複合体や、TOM 複合体を通過した β バレル型膜タンパク質の膜間部から外膜への組み込みを行う外膜トランスロケータの SAM 複合体、主にプレ配列を持つ前駆体の内膜透過や内膜への組み込みを担う内膜トランスロケータの TIM23 複合体、複数回貫通内膜タンパク質の内膜への組み込みを担う内膜トランスロケータの TIM22 複合体などがある (図 2).

N 末端に正電荷を持つ両親媒性ヘリックスを形成するプレ配列を持ち、ミトコンドリアのマトリクスあるいは内膜に局在するタンパク質は、内膜トランスロケータの TIM23 複合体によって輸送される (図 3). TIM23 複合体は Tim23, Tim17, Tim50, Mgr2 から構成されるコア複合体をもつ膜透過装置であり [17-19, 20-28], 4 回膜貫通内膜タンパク質の Tim23 と Tim17 が膜透過チャネルを形成する [17-19]. マトリクスへ輸送されるタンパク質は、この TIM23 コア複合体に加えて mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone (MMC) または presequence translocase-associated motor (PAM) タンパク質の機能が必要となる. MMC タンパク質はマトリクスの熱ショックタンパク質 Hsp70 (mtHsp70, 出芽酵母では Ssc1), mtHsp70 のヌクレオチド交換因子の Mge1/Yge1, mtHsp70 を TIM23 複合体にリクルートして mtHsp70 の足場として機能する Tim44, mtHsp70 の J タンパク質として機能する Pam18/Tim14, Pam16/Tim16 の複合体から成る [29-36]. mtHsp70/Ssc1 は ATP 加水分解のエネルギーを利用して前駆体タンパク質のアンフォールディングやマトリクスへの引き込み (内膜透過) を駆動するモーターとして働く. マトリクスではなく内膜への前駆体移行には Mgr2 が関与し、TIM23 複合体と呼吸鎖複合体の連携には Tim21 が関与すると考えられる.

マトリクス行の前駆体タンパク質は、TOM 複合体のレセプターサブユニットの Tom20 と Tom22 によりプレ配列が認識される. 続いて β バレル型膜タンパク質 Tom40 が形成する膜透過チャネルに移行し、チャネル内を通過して外膜を透過する. 外膜透過後、プレ配列は TIM23 複合

体構成因子の 1 つである Tim50 によって認識され、TIM23 複合体の膜透過チャンネルへと移行する。この移行には、内膜の膜電位 ($\Delta\Psi$) が必要である。 $\Delta\Psi$ は TIM23 複合体の膜透過チャンネルの開閉、プレ配列の膜透過チャンネルの通過にも貢献する [17-19,25,28]。その後、プレ配列には、マトリクスの mtHsp70 が結合し、mtHsp70, Tim44, Pam18/Tim14, Pam16/Tim16 等のモータータンパク質群によりマトリクスへと引き込まれて内膜を通過する。マトリクスの mtHsp70 による前駆体のアンフォールディングと引き込みについては、いくつかのメカニズムが提唱されてきたが、今日では主としてブラウニアンラチェット機構がはたらくものと考えられている。マトリクス内でプレ配列は切断酵素 Matrix Processing Peptidase (MPP) によって切断されて、成熟体となる。

一方プレ配列を持つが、TIM23 複合体により内膜に組み込まれる内膜タンパク質は、プレ配列の直後、または下流に、仕分け (ソーティング) シグナルと呼ばれる疎水性配列を持つ。これらの前駆体タンパク質は、マトリクス行きタンパク質と同じ機構で TOM 複合体を介して外膜を透過後、Tim50 によるプレ配列の認識を経て、膜電位依存的に TIM23 複合体の膜透過チャンネルに移行する。ここで仕分けシグナルが Tim23/17 チャンネル内で認識されると (その詳細は不明)、前駆体タンパク質の内膜透過が停止する。続いて Tim23/17 チャンネルがラテラルに (水平方向に) 開いて、仕分けシグナルの疎水性配列が内膜にリリースされる。この内膜へのリリースには Mgr2 等が関与することが考えられる。このように内膜への仕分け経路では、mtHsp70 を中心とする ATP 依存型のモータータンパク質群の機能は不要であり、 $\Delta\Psi$ のみがエネルギーとして必要になる。なお、前駆体タンパク質のプレ配列は、プレ配列がマトリクスに到達した時点で MPP によって切断されて成熟体となる [37,38]。

ミトコンドリア内膜に局在する、膜貫通配列を複数持つ AAC (ATP/ADP carrier) や PiC (Phosphate carrier) などのキャリアタンパク質、TIM23 複合体を構成する Tim23, Tim17 等は、プレ配列を持たず、成熟体部分にミトコンドリア行きのシグナルを持つ。これらの内膜タンパク質は外膜の TOM 複合体のレセプターサブユニットの Tom70, Tom20, Tom22 に認識され、Tom40 の膜透過チャンネルを通過する。続いて、膜間部のシャペロンである Tim9-Tim10 複合体または Tim8-Tim13 複合体 (small Tim) によって認識され [40-42]、内膜のもう一つのトランスロケータの TIM22 複合体に Tim9-Tim10-Tim12 を介して引き渡される。TIM22 複合体は、膜透過チャンネルを形成する Tim22 [39,40]、Tim9-Tim10 複合体と結合する Tim54 [40,41]、Tim54 のアセンブリー因子である Tim18 [40]、Tim18 のアセンブリー因子である Sdh3 [42] の 4 つの構成因子から成る。TIM22 複合体へと受け渡された前駆体タンパク質は、Tim22 が形成するチャンネルを介してラテラル方向に内膜へと組み込まれる (図 4)。このとき、mtHsp70 のようなモータータンパク質は不要であるが、 $\Delta\Psi$ が必要である [17-19]。

膜間部の可溶性タンパク質の多くはジスルフィド結合を形成する。こうしたタンパク質の膜間部への移行および酸化付加のフォールディング (ジスルフィド結合形成) は Mia40/Tim40 と Erv1 から成る MIA40/TIM40 経路によって行われる。この経路の基質の多くはツイン CX_nC モチーフ (C はシステイン、X は任意のアミノ酸、n=3 または 9 : アミノ酸の数) を持ち、ジスルフィド結

合を形成する。CX₉C モチーフと疎水性の残基が、膜間部行き配列 (ITS 配列) としてはたらくと考えられている[43-50]が、TOM 複合体の Tom22, Tom20, Tom70 等のレセプターサブユニットには認識されず、Tom40 チャンネルを通して外膜を通過する。その後、膜間部側で Mia40/Tim40 により認識され、複合体を一過的に形成する。Mia40/Tim40 上ではヘリックス構造が誘起され、ジスルフィド結合が導入される。ジスルフィド結合導入に際しては、基質の Cys 残基と Mia40/Tim40 の Cys 残基の間に分子間ジスルフィド結合が一過的に形成され、その後、ジスルフィド結合が基質分子内の Cys 間に移動することが明らかになっている。この Mia40/Tim40 による結合とジスルフィド結合導入が基質のサイトゾルへの逆戻りを防ぐトラップとして働くことで、基質の外膜透過が駆動されると考えられている[51,52]。還元型 Mia40/Tim40 は、FAD 結合型酸化酵素の Erv1 によって再度酸化されて、分子内にジスルフィド結合が再生される。還元型 Erv1 は電子を電子伝達系のシトクロム c を介してシトクロム酸化酵素へ、そして分子状酸素へと移動させることで、再び酸化型へと戻る [53,54] (図 5)。

MICOS 複合体を構成するサブユニットのうち、Mic10, Mic12, Mic27, Mic26, Mic60 は膜貫通配列をもつ内在性内膜タンパク質であり、Mic19 は膜貫通配列を持たない表在性内膜タンパク質である (図 2)。また、Mic60 は N 端にプレ配列を持つが、他のサブユニットはプレ配列を持たない。Mic60 はプレ配列を持つことから、TIM23 複合体によりミトコンドリア内膜へと組み込まれることが考えられる。一方 Mic12 は一回膜貫通型タンパク質であるがプレ配列を持たないため、TIM23 複合体によって内膜へと輸送されるかどうかは不明である。Mic10, Mic27, Mic26 ではプレ配列を持たず、さらに 2 回膜貫通型の内膜タンパク質であることから、内膜への仕分け、組み込み機構は不明である (ただし、Mic10 のミトコンドリア行シグナルとして、2 つの膜貫通領域の間のループに存在するアミノ酸の正電荷が働くことがわかっている [6])。

一方、表在性内膜タンパク質である Mic19 は、MIA40/TIM40 経路によりミトコンドリア膜間部に移行することが報告されている [12]。また哺乳類の Mic19 では、ミトコンドリア膜間部の局在化シグナルであるツイン CX₉C モチーフ (X は任意のアミノ酸) をもち、膜間部への移行途中に Mia40 と分子間ジスルフィド結合をつくることが示されている。さらに哺乳類の Mic19 では、N 末端に存在するミリストイル化モチーフが、ミトコンドリアへの移行に重要であることが報告されている[46]。出芽酵母の Mic19 では MIA40/TIM40 経路で輸送されることはわかっているが、ツイン CX₉C モチーフをもたないため、実際に Mia40 に認識されるかどうかは不明である。また、哺乳類と同様にミリストイル化モチーフがミトコンドリア移行に重要なのかどうか、さらにはミリストイル基がどのようにミトコンドリアへの取り込み、あるいは膜間部への移行を助けるのか等は、全く不明である。

そこで本研究では、出芽酵母の MICOS 複合体構成因子の Mic10, Mic12, Mic19, Mic26, Mic27, Mic60 がどのような機構でミトコンドリアへと運ばれるかを明らかにすることを目的とした。MICOS 複合体構成因子のミトコンドリアへの輸送にどの経路とトランスロケータが関与するかについては、この分野できわめて強力な手法として用いられる *in vitro* でのタンパク質取り込み (インポート) 実験を利用した。すなわち、*in vitro* で無細胞タンパク質合成系を用いてラジオア

イソトープで標識した前駆体タンパク質を合成，この前駆体タンパク質を酵母細胞から単離したミトコンドリアとインキュベートしミトコンドリアへと取り込ませた．この後，このサンプルにタンパク質分解酵素を加えて，取り込まれなかったタンパク質を消化し，取り込まれたタンパク質のみ **SDS-PAGE** で展開しラジオイメージングで検出，定量した．用いるミトコンドリアを，トランスロケータの変異株から単離した物を使用したり，取り込みのエネルギー要求性を調べることで，ミトコンドリアへの取り込み経路とトランスロケータの関与を明らかにすることができる．

この結果，ミトコンドリア内膜に局在する **Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, Mic60** はすべて，**TIM23** 複合体経路で内膜に仕分けられ，組み込まれることがわかった．一方 **Mic19** は，自身のもつシステインがミトコンドリア膜間部への移行シグナルとして認識され **TIM40/MIA40** 経路でミトコンドリア膜間部に移行されることがわかった．さらに，**Mic19** の膜間部への移行は **Mic19** に付加された，構造をとらない **DUF** ドメインによって抑制されるが，この抑制の解除にミリスチル基の付加が重要であることがわかった．このことを説明する機構として，エントロピー駆動型の膜透過機構を新たに提案することができた．こうしたエントロピー駆動型のタンパク質のオルガネラ移行は，他のタンパク質，他のオルガネラでも働きうるものと考えられる．

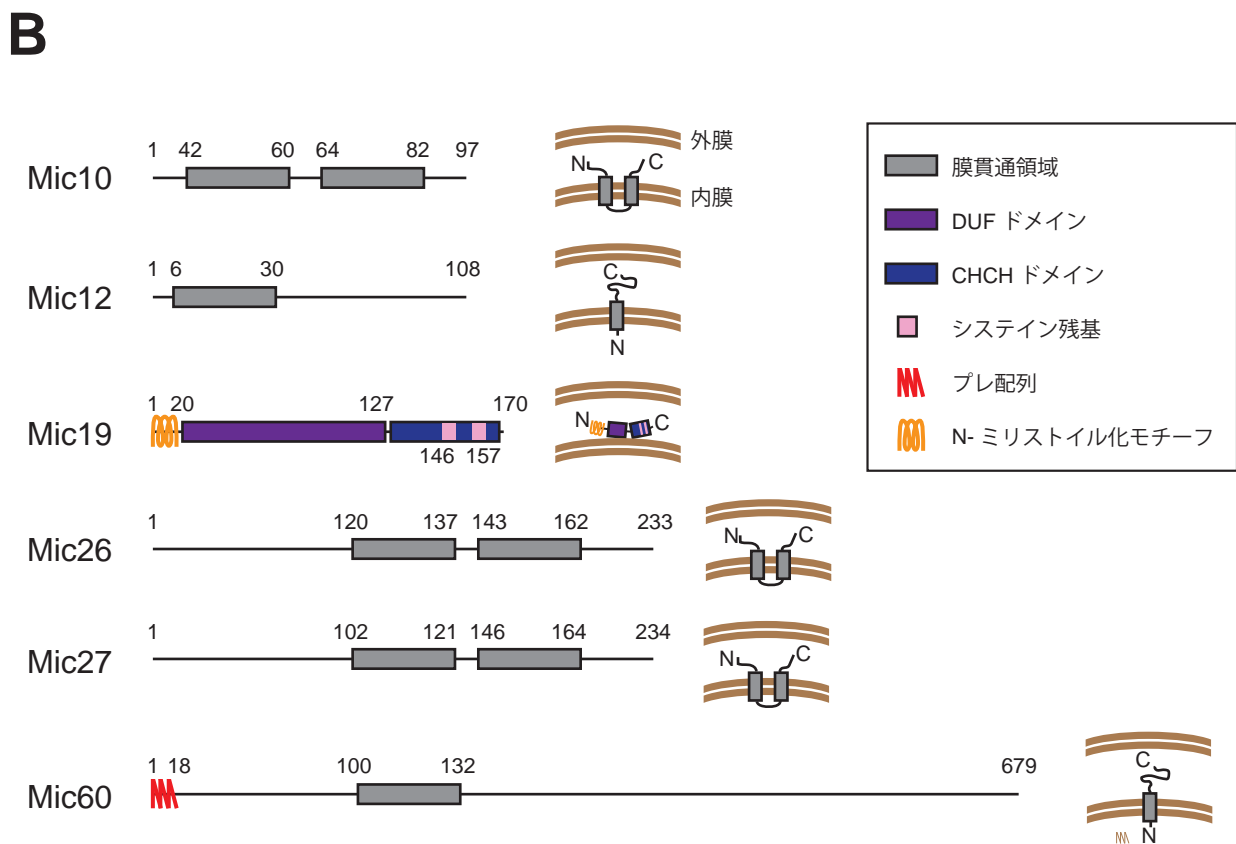
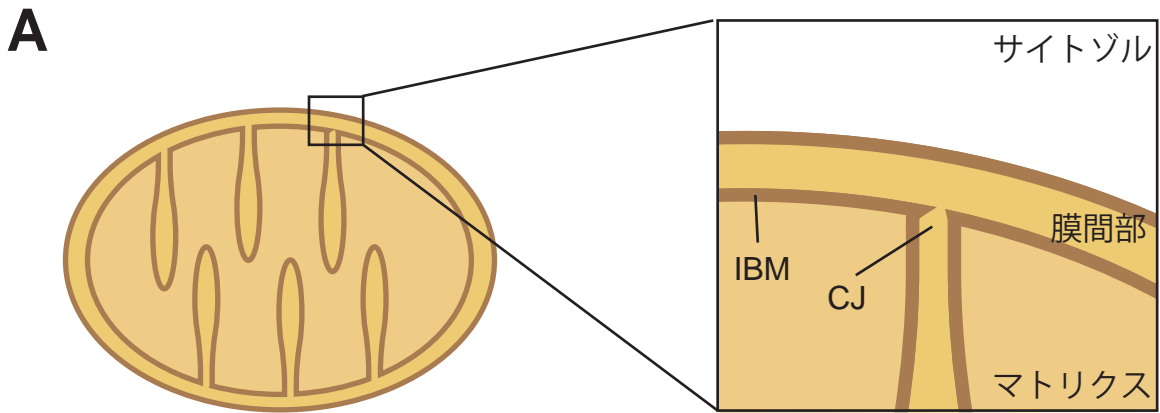


図1 クリステ膜と MICOS 複合体構成因子

A. ミトコンドリアとその区画の模式図. B. 出芽酵母で見られる6つのMICOS複合体構成因子の予想されるドメインをダイアグラムで表した図.

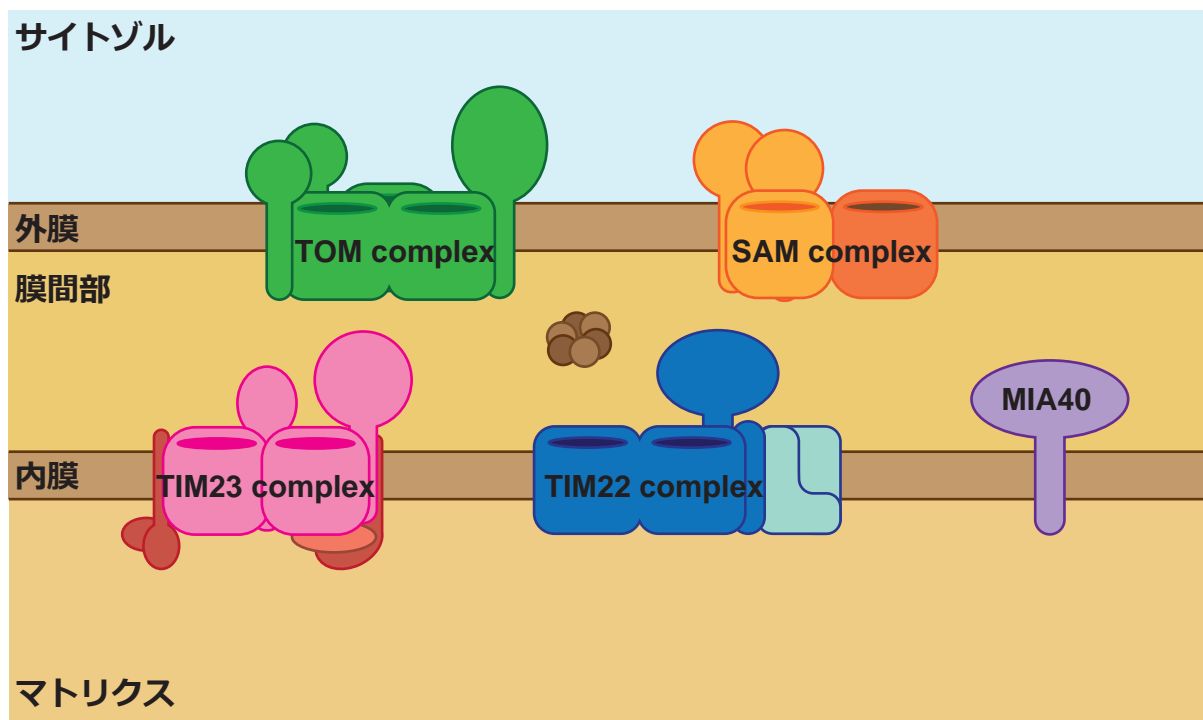


図2 ミトコンドリアの膜透過装置

出芽酵母で見られる，主な膜透過装置を模式的にあらわしたもの．これらの膜透過装置の共同的な働きにより，サイトゾルで合成されたタンパク質はミトコンドリアへと運ばれ正しい区画へと仕分けされる．

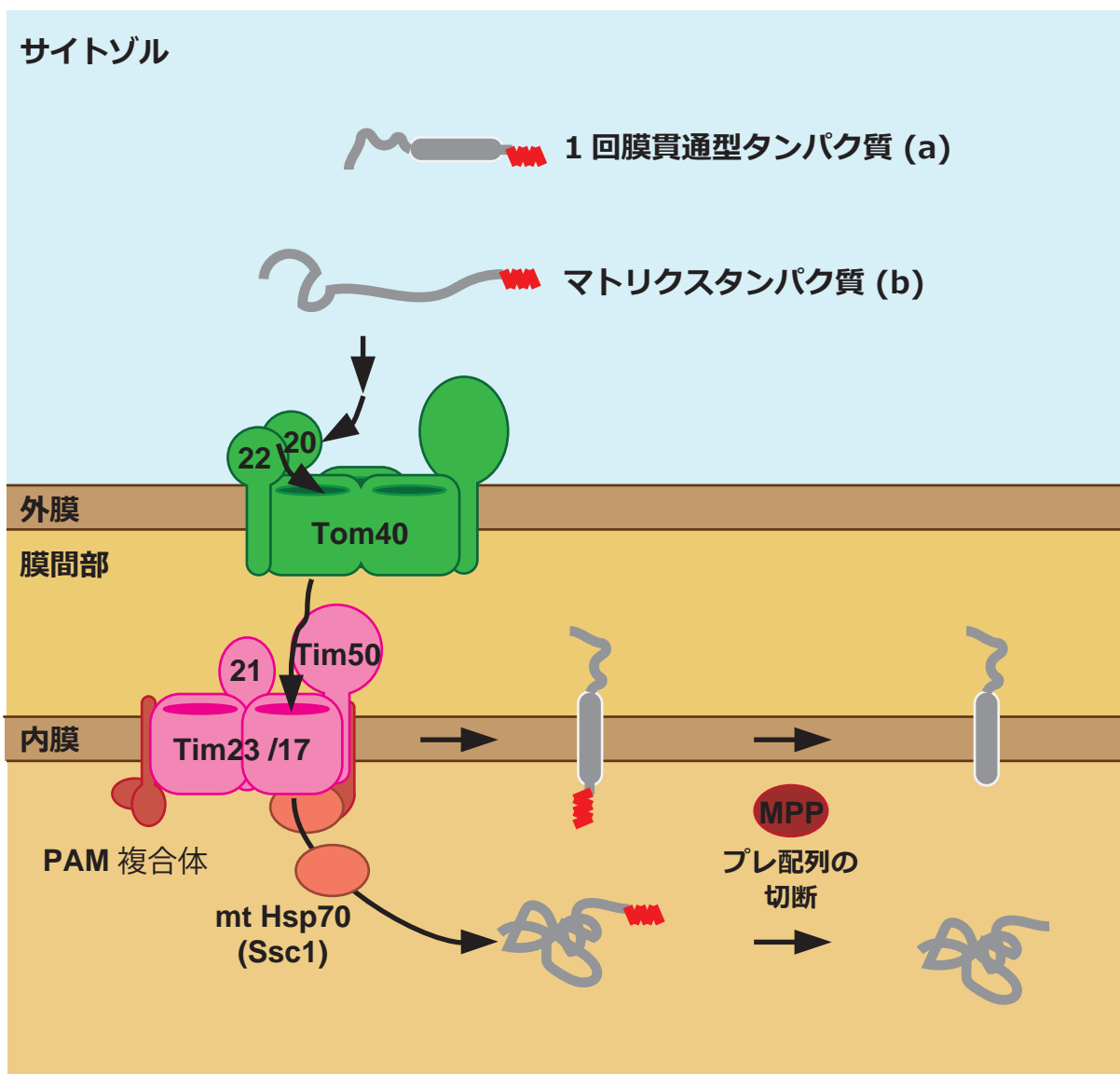



図 3 TIM23 複合体による輸送機構の概略図。

TIM23 複合体を用いた内膜あるいはマトリックスに局在するタンパク質の輸送では、基質タンパク質は TOM 複合体のレセプターである Tom20, Tom22 により認識されたのちチャネルへと運ばれ外膜を透過する。外膜透過後は、Tim50 によってプレ配列 () が認識される。プレ配列が認識されると基質は TIM23 複合体のチャネルへと運ばれる。こののち、内膜に局在するタンパク質は膜電位を用いてミトコンドリアマトリクスへと引きこまれるが、仕分けシグナルにより輸送が途中で停止し内膜へとラテラルに放出される (a)。マトリクスへと運ばれるタンパク質は膜電位を用いチャネルを通過後、mtHsp70 や PAM 複合体といったモータタンパク質によりマトリクスへと運ばれる (b)。これらのタンパク質の輸送後、プレ配列は MPP によって切断される。

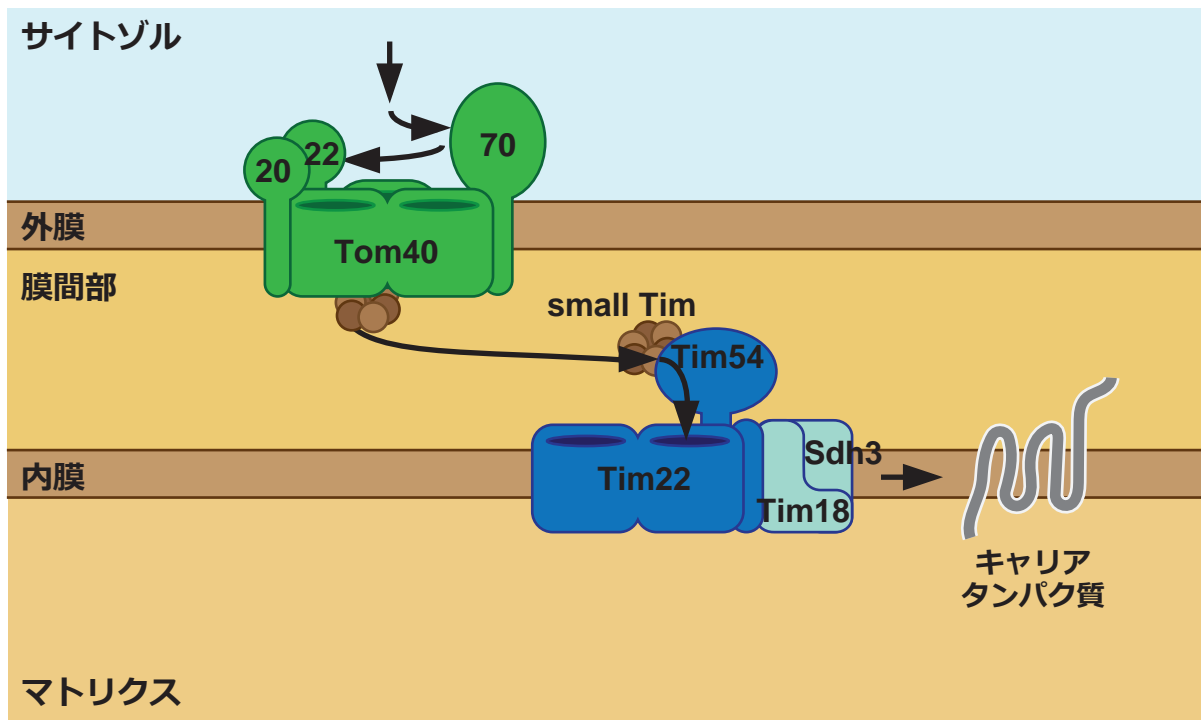


図4 TIM22 複合体による輸送機構の概略図.

キャリアタンパク質を代表とする膜貫通配列を複数持ち内膜に局在するタンパク質は、ミトコンドリア行シグナルとして、インターナルシグナルを持つ。このインターナルシグナルがTOM 複合体のレセプターである Tom70, Tom20, Tom22 に認識され、TOM 複合体のチャネルへと基質タンパク質は運ばれる。外膜透過後は、分子シャペロンである small Tim 複合体により TIM22 複合体へと運ばれる。TIM22 複合体へと受け渡された前駆体タンパク質は、Tim22 が形成するチャネルを介してラテラル方向に内膜へと組み込まれる。

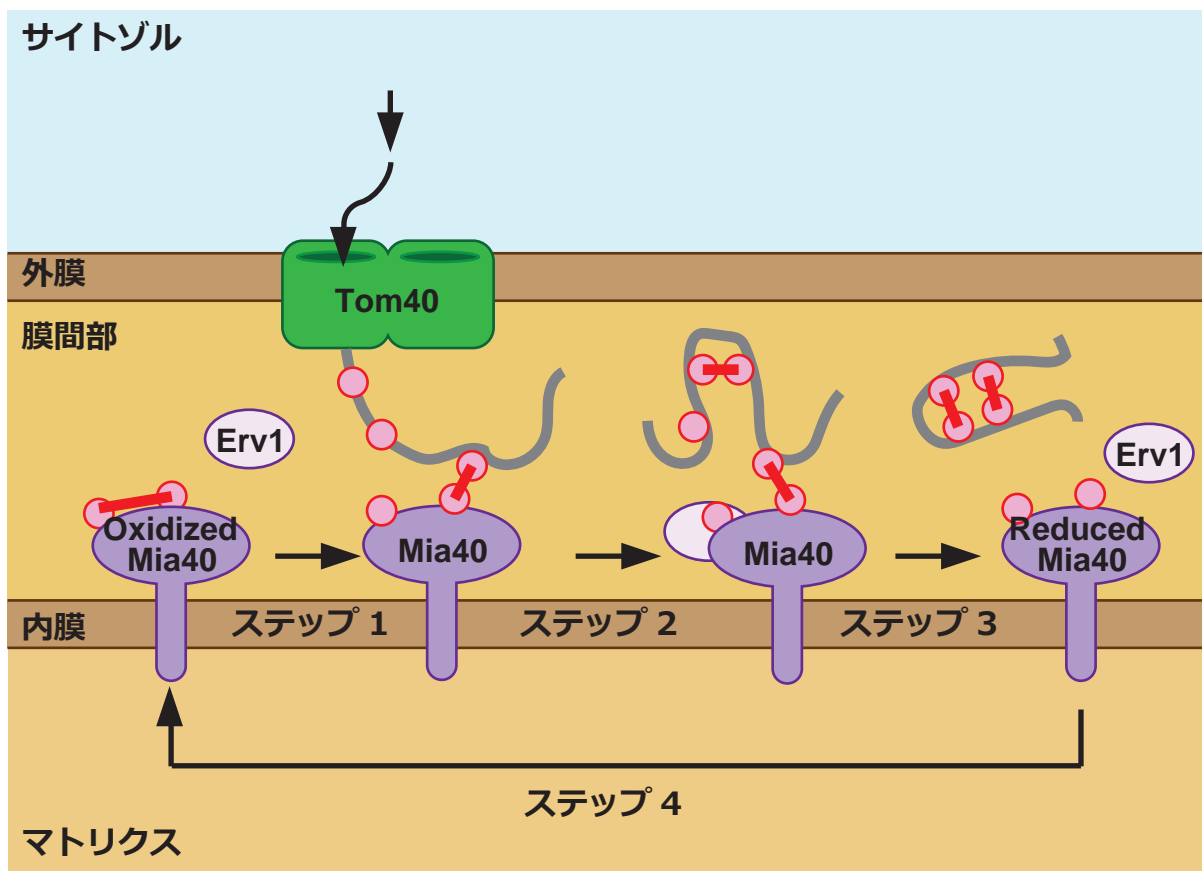


図5 Mia40による輸送機構の概略図.

ツイン CX_9C あるいは CX_3C モチーフを持ち膜間部に局在するタンパク質はミトコンドリアへと運ばれる際に Mia40 のシステインと分子間でジスルフィド結合をつくる (ステップ1). k 基質内に分子内ジスルフィド結合が導入され (ステップ2), 膜間部へと放出される (ステップ3). このようにジスルフィド結合が基質に導入されると, サイトゾルへの逆戻りを防ぐトラップとして働き, サイトゾルへの逆戻りを防ぐため膜間部への局在が可能になる. また, この一連の反応により還元された Mia40 は Erv1 により再酸化され, 輸送が可能になる (ステップ4).

なおこの図では, ● はシステインをあらわし, — はジスルフィド結合を表す.

2. 材料と方法

2-1 実験材料

2-1-1. 酵母株

本研究で使用した酵母株を Table.1 に示した. 培養には, Lactate medium (0.3% (w/v) yeast extract, 0.05% (w/v) D-glucose, 0.05% (w/v) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05% (w/v) NaCl, 0.06% (w/v) $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1% (w/v) KH_2PO_4 , 0.1% (w/v) NH_4Cl , 2.0% (w/v) lactic acid: 5N NaOH で pH 5.6 に調製), YPD (1.0% (w/v) yeast extract, 2.0% (w/v) polypeptone, 2.0% (w/v) D-glucose), YPG (1.0% (w/v) yeast extract, 2.0% (w/v) polypeptone, 2.0% (w/v) Glycerol, 0.05% (w/v) D-glucose), SCD (0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% (w/v) vitamin assay casamino acid, 2.0% (w/v) D-glucose), SCLac (0.67% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% (w/v) vitamin assay casamino acid, 2.0% (w/v) lactic acid: 5N NaOH で pH 5.6 に調製) を使用した. SC 培地には必要に応じてアミノ酸を Rose らの方法に従って加えた[55]. 寒天培地には 2% (w/v) になるように agar を加えた. G418 培地には 0.2 mg/ml になるように G418 を加えた.

2-1-2. 大腸菌株

本研究では組み換え DNA 操作に大腸菌株 XL2-Blue MRF' ($\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB\text{-}hsdSMR\text{-}mrr)173 \text{endA1 supE44 thi-1 recA1 gryA96 relA1 lac}^- [\text{F}' \text{proAB}^+ \text{lacI}^q \text{lacZd}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r)]$) 株を使用した. タンパク質の発現には大腸菌株 Rosetta (DE3) ($\text{F}' \text{ompT hsdS}_{\text{B}}(\text{r}_\text{B}^- \text{m}_\text{B}^-) \text{gal dcm (DE3)/pRARE2 [argN5 argX proL leuW metT argW thrT glyT thrU argU ileX P15A Cam}^r]$) を用いた. 大腸菌の培養には LB+amp 培地 (2% LB Broth, 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin) を用いた. 寒天培地には 1.5% (w/v) agar を加えた.

2-1-3 オリゴヌクレオチドプライマーおよびプラスミド

本研究で使用したオリゴヌクレオチドプライマーを Table. 2 に, プラスミドを Table. 3 に示した.

2-1-4 抗血清および抗体

本研究で使用した抗血清および抗体のうち, 一次抗体は Anti DYKDDDDK tag, Monoclonal Antibody (和光純薬), Anti 6 \times His, Monoclonal Antibody (和光純薬) は既製品のものを用い, 他のものは当研究室でウサギに免疫して作製したものを用いた. また二次抗体として, Goat Anti-Rabbit IgG H&LCy5 (Abcam), Goat Anti-mouse IgG H&L Cy5 (Abcam) を用いた. なお, 本研究で作製した抗体の抗原の調整方法は 2-2-4 に, ウサギへの免疫方法は 2-2-5 に記載した.

Table 1

Strain	Genotype	Source
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100</i>	
D273-10B	<i>MATa</i>	
<i>GAL-Tim22</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 TIM10::GAL7-TIM22-CgHIS3</i>	Yamano <i>et al.</i> , 2005 [56]
<i>TIM50</i>	<i>MATa ade2 his3 ura3 leu2 trp1 can1 tim50Δ::CgHIS3 [pRS314-Tim50-WT]</i>	Tamura <i>et al.</i> , 2009 [27]
<i>tim50-278,282,286</i>	<i>MATa ade2 his3 ura3 leu2 trp1 can1 tim50Δ::CgHIS3 [pRS314-Tim50-279,282,286]</i>	Tamura <i>et al.</i> , 2009 [27]
<i>SSC1</i>	<i>MATa his4-713 lys2 ura3-52 Atrp1 leu2-3, 112</i>	Gambil <i>et al.</i> , 1993 [36]
<i>ssc1-3</i>	<i>MATa his4-713 lys2 ura3-52 Atrp1 leu2-3, 112 ssc1-3::CgLEU2</i>	Gambil <i>et al.</i> , 1993 [36]
<i>MIA40-WT</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 Mia40Δ::CgHIS3 [pRS314-Mia40WT]</i>	Kawano <i>et al.</i> , 2009 [51]
<i>mia40-F311E</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 Mia40Δ::CgHIS3 [pRS314-Mia40F311E]</i>	Kawano <i>et al.</i> , 2009 [51]
<i>tom70/71 Δ</i>	<i>MATa ade2-1 leu2-3 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 can1-100 tom70Δ::TRP1 tom71Δ::HIS3</i>	Kondo-Okamoto <i>et al.</i> , 2008 [57]
<i>GAL-Sam50</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112trp1-1 can1-100 GAL7-Sam50::clonNAT</i>	This study
<i>Mic19 Δ</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 Mic19Δ::kanMX</i>	This study
<i>Mic19 ΔMic19(xx)-FLAG</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 Mic19Δ::kanMX [pRS314-Mic19(xx)-FLAG]</i>	This study
<i>OsTIR1</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 ura3::ADH1p-OsTIR1-9xMYC</i>	当研究室松本博士より供与
<i>tom20-AID*-9xMYC</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 ura3::ADH1p-OsTIR1-9xMYC tom20-AID*-9xMYC-Kan</i>	当研究室松本博士より供与
<i>tom20-3xmini-AID</i>	<i>MATa ade2-1 his3-11, 15 ura3-1 leu2-3, 112 trp1-1 can1-100 ura3::ADH1p-OsTIR1-9xMYC tom20-3xmini AID-Kan</i>	当研究室松本博士より供与

*XX: Mic19 variants

Table 2

Primers for plasmid constructions	
Primer name	Sequence(5'→3')
EcoRI-Mic10(-50)-F	TCCGAATTCGGCAGATTAACCTTTGCTACGAG
BamHI-Mic10-stop-R	TCCGGATCCCTAAACCTTCGAGGATCTGAGG
EcoRI-Mic12(-50)-F	TCCGAATTCGGGGACAGAACAGACAGTGG
BamHI-Mic12-stop-R	TCCGGATCCCTAATTCTTACCCAGGAGT
SacI-Mic19(-50)-F	TTCCGAGCTCAAAATTCAGAACAACAA
BamHI-Mic19-stop-R	TCCGGATCCTCAACCCATAACGAGCTTCT
EcoRI-Mic27(-10)-F	TTTGCACTCGAGAATTCAGCTTCCAAAATGGTAAATTTTATG
Sall-Mic27-stop-R	CGGCCGCCCGGGTCGACTCATGCTTGCTCCAACCTTTTC
EcoRI-Mic26(-50)-F	TCCGAATTCGACTATAGCGCTCAAGGAT
BamHI-Mic26-stop-R	TCCGGATCCTCACTTCACGTTAACGCCAG
EcoRI-Mic60-F	TTTGCACTCGAGAATTCATGCTAAGAACTACTG
Sall-Mic60-stop-R	CGGCCGCCCGGGTCGACTCAACACGTCCTTATTTC
Mic19-C146S-F	GCAAAATTGACTGAGTCTCTTTTGGCCAATAAGGGC
Mic19-C146S-R	CGTTTAACTGACTCAGAGAAAACCGGTTATTCCCG
Mic19-C157S-F	GGGCAAGCCATTGAATCTTACGAAGAGATGGAAG
Mic19-C157S-R	CCCGTTCGGTAACTTAAGAATGCTTCTACCTT
Mic19-G2A-F	CTAATACAGAGTCAATCATGGCTTCAAACACTTCCAAAG
Mic19-G2A-R	GATTATGTCTCAGTTAGTACCGAAGTTTGTGAAGGTTTC
Mic19(Δ20)-F	CTAATACAGAGTCAATCATGCTAACACAGATCGATTTTTC
SP6-R	CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGG
4Z-BamHI-Mic19(-50)-F	CGGTACCCGGGGATCCAAATTCAGAACAACAAAC
Mic19(-20)-XhoI-DHFR-R	ATGGTCGAACCTCGAGCGGAGTATAGACTTGTGTTTTTC
pTNT-EcoRI-Tim9-F	TTTGCACTCGAGAATTCATGGACGCAATTGAACCTCCAAAG
pTNT-Sall-Tim9-R	CGGCCGCCCGGGTCGACTTATCGGCCCAAGCCTTGTCCC
EcoRI-Mic19WT(1-)-F	TTTGCACTCGAGAATTCATGGGTTCAAACACTTCCAAAG
EcoRI-Mic19G2A(1-)-F	TTTGCACTCGAGAATTCATGGGTTCAAACACTTCCAAAG
EcoRI-Mic19(-20)-R	ATGCGTCCATGAATTCGGGAGTATAGACTTGTGTTTTTC
EcoRI-Mic19(-127)-R	ATGCGTCCATGAATTCCTTACCTTTGGCACCCCATATTTTC
EcoRI-Mic19(21-)-F	TTTGCACTCGAGAATTCATGCTAACACAGATCGATTTTTTC
XhoI-Mic19WT(1-)-F	TCCTTTTGCAGTCTGAGATGGGTTCAAACACTTCCAAAG
XhoI-Mic19G2A(1-)-F	TCCTTTTGCAGTCTGAGATGGGTTCAAACACTTCCAAAG
XhoI-Mic19(21-)-F	TCCTTTTGCAGTCTGAGATGCTAACACAGATCGATTTTTTC
XhoI-Mic19(-127)-R	TTTCAGTCATCTCGAGTTTACCTTTTGGCACCCCATATTTTC
EcoRI-Mdm35-F	TTTGCACTCGAGAATTCATGGGGAATATAATGTCAGC
Sall-Mdm35-R	CGGCCGCCCGGGTCGACTCATTTGTCAACTTCTTTAGTTTG
Mdm35G2A-F	CTCGAGAATTCATGGCGAATATAATGTCAGC
Mic19(20)-XhoI-Mic19(21)-F	CAAGTCTATACTCCGCTCGAGCTAACACAGATCG
Mic19(127)-KpnI-Mic19(128)-R	TTTTATCAGAGGTACCTTTACCTTTTGGCACC
met-XhoI-Mic19(21)-F	CAGAGTCAATCATGCTCGAGCTAACACAGATCG
Mic19(20)-XhoI-PhoA(140-)-F	CTATATCCGCTCGAGGCGCTGGGCGTTCGATATTC
Mic19(127)-KpnI-PhoA(140-)-R	CCCGGTACCACCAGCGGTTGCCGTTTCAGC
Met-xhoI-phoA(140-)-F	GTCAATCATGCTCGAGGCGCTGGGCGTTCGATATTC
phoA(140-220)-F	CAGCTGCTTAACGCTTCTGATAAAAAAACC
phoA(140-200)-F	GACCAAGTGAATAATGTTCTGATAAAAAAACC
BamHI-3FLAG-F	GCCGGATCCGACTACAAAGACCATG
Sall-3FLAG-R	GCCGTCGACTCACTTATCATCATCATCC
BamHI-Mic19non-R	GCCGGATCCACCCATAACGAGCTTC
SacI-mic19pro-F	CCCAGCTCAAAATAGCAAAAAAAGGC
XhoI-mic19pro-R	CCCCTCGAGTTTTTTGATTAGCAATCTC
XhoI-mic19ter-F	AATCAAAAAACTCGAGATAAGAAAAAGTATACATAAACTCGAC
KpnI-mic19ter-R	ACAAAAGCTGGGTACCATGGTACAAATTTAATGATGATAAAG
XhoI-mic19(-50)FLAG-F	AATCAAAAAACTCGAGAAATTCAGAACAACAAAC
XhoI-mic19FLAG-R	TTTTTCTTATCTCGAGTCACTTATCATCATCATCC
Primers for deletion	
Primer name	Sequence(5'→3')
Mic19-deletion-F	ACAAAAACAAGGTGGTATATCGACTAATACAGAGTCAATCGTTGTAAAACGACGGCCAGT
Mic19-deletion-R	CGAATTCCTTTTGGTCGAGTTTATGTATACTTTTCTTATCACAGGAAACAGCTATGACC
Primers for C-terminal FLAG tagging	
Primer name	Sequence(5'→3')
TIM40-tag-F	GCAGAGCAATCAGATGTGAAAAAAGAACCATTGAATGAGGAATCCAAACCTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
TIM40-tag-R	GTATCATCCTTTTATACTTTTATACTTTTACGTTCCGGGAGATTTTCAGGAGATTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC

Table 3

Plasmid name	Expressed protein	Vector	primer	Site	Template DNA or Source
pGEM4Z-Mic10	Mic10	pGEM4Z	EcoRI-Mic10(-50)-F BamHI-Mic10-stop-R	EcoRI/BamHI	yeast genomic DNA
pGEM4Z-Mic12	Mic12	pGEM4Z	EcoRI-Mic12(-50)-F BamHI-Mic12-stop-R	EcoRI/BamHI	yeast genomic DNA
pGEM4Z-Mic19	Mic19	pGEM4Z	SacI-Mic19(-50)-F BamHI-Mic19-stop-R	SacI/BamHI	yeast genomic DNA
pTNT-Mic27	Mic27	pTNT	EcoRI-Mic27(-10)-F Sall-Mic27-stop-R	EcoRI/BamHI	yeast genomic DNA
pGEM4Z-Mic26	Mic26	pGEM4Z	EcoRI-Mic26(-50)-F BamHI-Mic26-stop-R	EcoRI/BamHI	yeast genomic DNA
pTNT-Mic60	Mic60	pTNT	EcoRI-Mic60-F Sall-Mic60-stop-R	EcoRI/BamHI	yeast genomic DNA
pGEM4Z-Mic19C146S	Mic19 C146S	pGEM4Z	Mic19-C146S-F Mic19-C146S-R	N/A	pGEM4Z-Mic19
pGEM4Z-Mic19C157S	Mic19 C157S	pGEM4Z	Mic19-C157S-F Mic19-C157S-R	N/A	pGEM4Z-Mic19
pGEM4Z-Mic19C146S/C157S	Mic19 C146S/C157S	pGEM4Z	Mic19-C146S-F Mic19-C157S-R	N/A	pGEM4Z-Mic19
pGEM4Z-Mic19G2A	Mic19 G2A	pGEM4Z	Mic19-G2A-F Mic19-G2A-R	N/A	pGEM4Z-Mic19
pGEM4Z-Mic19Δ20	Mic19 Δ20	pGEM4Z	Mic19(Δ20)-F SP6-R	N/A	pGEM4Z-Mic19
pGEM4Z-Mic19G2A/C146S/C157S	Mic19 G2A/C146S/C157S	pGEM4Z	Mic19-G2A-F Mic19-G2A-R	N/A	pGEM4Z-Mic19C146S/C157S
pTNT-Tim9	Tim9	pTNT	pTNT-EcoRI-Tim9-F pTNT-Sall-Tim9-R	EcoRI/Sall	yeast genomic DNA
pTNT-Mic19wt(1-20)-Tim9	Mic19(1-20)-Tim9	pTNT-Tim9	EcoRI-Mic19WT(1-)-F EcoRI-Mic19(-20)-R	EcoRI	pGEM4Z-Mic19
pTNT-Mic19G2A(1-20)-Tim9	Mic19 G2A(1-20)-Tim9	pTNT-Tim9	EcoRI-Mic19G2A(1-)-F EcoRI-Mic19(-20)-R	EcoRI	pGEM4Z-Mic19
pTNT-Mic19WT(1-127)-Tim9	Mic19(1-127)-Tim9	pTNT-Tim9	EcoRI-Mic19WT(1-)-F EcoRI-Mic19(-127)-R	EcoRI	pGEM4Z-Mic19
pTNT-Mic19G2A(1-127)-Tim9	Mic19 G2A(1-127)-Tim9	pTNT-Tim9	EcoRI-Mic19G2A(1-)-F EcoRI-Mic19(-127)-R	EcoRI	pGEM4Z-Mic19G2A
pTNT-Mic19(21-127)-Tim9	Mic19 (21-127)-Tim9	pTNT-Tim9	EcoRI-Mic19(21-)-F EcoRI-Mic19(-127)-R	EcoRI	pGEM4Z-Mic19Δ20
pTNT-Mdm35	Mdm35	pTNT	EcoRI-Mdm35-F Sall-Mdm35-R	EcoRI/Sall	yeast genomic DNA
pTNT-Mdm35G2A	Mdm35 G2A	pTNT	Mdm35G2A-F SP6-R	N/A	pTNT-Mdm35
pGEM4Z-Mic19WT(1-20)-XhoI-(21-127)-KpnI-(128-170)	Mic19(1-20)-LE-Mic19(21-127)-GT-Mic19(128-170)	pGEM4Z	Mic19(20)-XhoI-Mic19(21)-F Mic19(127)-kpnI-Mic19(128)-R	N/A	pGEM4Z-Mic19
pGEM4Z-Mic19G2A(1-20)-XhoI-(21-127)-KpnI-(128-170)	Mic19 G2A(1-20)-LE-Mic19(21-127)-GT-Mic19(128-170)	pGEM4Z	Mic19(20)-XhoI-Mic19(21)-F Mic19(127)-kpnI-Mic19(128)-R	N/A	pGEM4Z-Mic19G2A
pGEM4Z-XhoI-(21-127)-KpnI-(128-170)	Mic19 (21-127)-GT-Mic19(128-170)	pGEM4Z	met-XhoI-Mic19(21)-F Mic19(127)-kpnI-Mic19(128)-R	N/A	pGEM4Z-Mic19Δ20
pGEM4Z-Mic19WT(1-20)-phoA(140-240)-(128-170)	Mic19(1-20)-LE-PhoA(140-240)-GT-Mic19(128-170)	pGEM4Z-Mic19WT(1-20)-xhoI-(21-127)-KpnI-(127-170)	Mic19(20)-XhoI-PhoA(140-)-F Mic19(127)-KpnI-PhoA(140-)-R	XhoI/KpnI	E.coli genomic DNA
pGEM4Z-Mic19G2A(1-20)-phoA(140-240)-(128-170)	Mic19 G2A(1-20)-LE-PhoA(140-240)-GT-Mic19(128-170)	pGEM4Z-Mic19G2A(1-20)-xhoI-(21-127)-KpnI-(127-170)	Mic19(20)-XhoI-PhoA(140-)-F Mic19(127)-KpnI-PhoA(140-)-R	XhoI/KpnI	E.coli genomic DNA
pGEM4Z-phoA(100)-(128-170)	PhoA(140-240)-Mic19(128-170)	pGEM4Z-xhoI-(21-127)-KpnI-(127-170)	Met-xhoI-phoA(140-)-F Mic19(127)-KpnI-PhoA(140-)-R	XhoI/KpnI	E.coli genomic DNA
pGEM4Z-phoA(80)-(128-170)	PhoA(140-220)-Mic19(128-170)	pGEM4Z-phoA(100)-(127-170)	phoA(140-220)-F SP6-R	N/A	pGEM4Z-phoA(140-220)-(127-170)
pGEM4Z-phoA(60)-(128-170)	PhoA(140-200)-Mic19(128-170)	pGEM4Z-phoA(100)-(127-170)	phoA(140-200)-F SP6-R	N/A	pGEM4Z-phoA(140-200)-(127-170)
pGEM4Z-3×FLAG	3×FLAG	pGEM4Z	BamHI-3FLAG-F Sall-3FLAG-R	BamHI/Sall	PFA6a-3×FLAG
pGEM4Z-Mic19WT-3×FLAG	Mic19-3×FLAG	pGEM4Z-3×FLAG pGEM4Z	SacI-Mic19(-50)-F BamHI-Mic19non-R	SacI/BamHI	pGEM4Z-Mic19
pGEM4Z-Mic19G2A-3×FLAG	Mic19 G2A-3×FLAG	pGEM4Z-3×FLAG pGEM4Z	SacI-Mic19(-50)-F BamHI-Mic19non-R	SacI/BamHI	pGEM4Z-Mic19G2A
pGEM4Z-Mic19Δ20-3×FLAG	Mic19 Δ20-3×FLAG	pGEM4Z-3×FLAG pGEM4Z	SacI-Mic19(-50)-F BamHI-Mic19non-R	SacI/BamHI	pGEM4Z-Mic19Δ20
pGEM4Z-Mic19C146S/C157S-3×FLAG	Mic19 C146S/C157S-3×FLAG	pGEM4Z-3×FLAG pGEM4Z	SacI-Mic19(-50)-F BamHI-Mic19non-R	SacI/BamHI	pGEM4Z-Mic19C146S/C157S
pGEM4Z-Mic19G2A/C146S/C157S-3×FLAG	Mic19 G2A/C146S/C157S-3×FLAG	pGEM4Z-3×FLAG pGEM4Z	SacI-Mic19(-50)-F BamHI-Mic19non-R	SacI/BamHI	pGEM4Z-Mic19G2A/C146S/C157S
pGEM4Z-pSu9-DHFR	Su9-DHFR	N/A	N/A	N/A	Kanamori <i>et al.</i> , 1999
pGEM4Z-Tim23	Tim23	N/A	N/A	N/A	N/A
pGEM4Z-AAC	AAC	N/A	N/A	N/A	Tamura <i>et al.</i> , 2009
pRS314	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pRS314-pro	N/A	pRS314	SacI-mic19pro-F xhoI-mic19pro-R	SacI/XhoI	yeast genomic DNA
pRS314-pro-ter	N/A	pRS314-pro	XhoI-mic19ter-F KpnI-mic19ter-R	XhoI/KpnI	yeast genomic DNA
pRS314-Mic19WT-FLAG	Mic19-3×FLAG	pRS314-pro-ter	XhoI-mic19(-50)FLAG-F XhoI-mic19FLAG-R	XhoI	pGEM4Z-Mic19WT-3×FLAG
pRS314-Mic19G2A-FLAG	Mic19 G2A-3×FLAG	pRS314-pro-ter	XhoI-mic19(-50)FLAG-F XhoI-mic19FLAG-R	XhoI	pGEM4Z-Mic19G2A-3×FLAG
pRS314-Mic19Δ20-FLAG	Mic19 Δ20-3×FLAG	pRS314-pro-ter	XhoI-mic19(-50)FLAG-F XhoI-mic19FLAG-R	XhoI	pGEM4Z-Mic19Δ20-3×FLAG
pRS314-Mic19C146S/C157S-FLAG	Mic19 C146S/C157S-3×FLAG	pRS314-pro-ter	XhoI-mic19(-50)FLAG-F XhoI-mic19FLAG-R	XhoI	pGEM4Z-Mic19C146S/C157S-3×FLAG
pRS314-Mic19G2A/C146S/C157S-FLAG	Mic19 G2A/C146S/C157S-3×FLAG	pRS314-pro-ter	XhoI-mic19(-50)FLAG-F XhoI-mic19FLAG-R	XhoI	pGEM4Z-Mic19G2A/C146S/C157S-3×FLAG

2-2 実験方法

2-2-1 遺伝子操作

組み換え遺伝子操作および PCR 法は Sambrook ら(2001)の方法に従った[58]. PCR 法には TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ) , KOD-plus- (TOYOBO) を用い, PCR で増幅した DNA 断片の精製・ゲルからの DNA の回収には illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification System (GE Healthcare Bio-Science)をもちいた. 制限酵素処理はタカラバイオの各種制限酵素を用いた. DNA のライゲーションには DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ) や In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ)を用いた. 点突然変異あるいは欠損の導入は PCR を用いた Quick Change 法により行った. 大腸菌からのプラスミドの回収には Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いた.

DNA 塩基配列の解析は Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction ver 3.1 (Life Technologies) および, ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies)を用いた.

2-2-2 DNA の回収

1 ml の YPD 培地で培養した酵母を, $2,500 \times g$, 室温, 30 秒間の遠心により集菌し, Yeast DNA Extraction Kit (Thermo fisher SCIENTIFIC) によって DNA を回収した. 回収した DNA は TE に溶解しゲノム DNA 画分とした.

2-2-3 プラスミドの構築

プラスミドの構築はそれぞれ, Table. 3 に示した鋳型とプライマー, 制限酵素を用いて行った. プライマーの配列は Table. 2 に記載した.

2-2-4 酵母株の作製

a. *Mic19Δ* 株の作製

プラスミド pBluescript-kanMX4[59]を鋳型にし, Mic19-deletion-F, Mic19-deletion-Rを用いて DNA 断片を増幅させた. この DNA 断片を用い, Megan Bergkessel ら (2013)[60] の相同組み換えを用いた方法により酵母株 W303-1A への形質転換を行った. G418 培地によりコロニーを選択したのち, 変異が導入されたかを PCR 法により確かめた.

b. *mia40-FLAG* 株の作製

プラスミド pFA6a-FLAG-kanMX[61]を鋳型にし, Tim40-tag-F, Tim40-tag-R を用いて DNA 断片を増幅させた. この DNA 断片を用い, Megan Bergkessel ら (2013)[60] の相同組み換えを用いた方法により酵母株 W303-1A への形質転換を行った. G418 培地によりコロニーを選択したのち, 変異が導入されたかを PCR 法により確かめた.

c. 酵母株へのプラスミドの導入

酵母にプラスミド pRS314/Mic19(X)-FLAG を導入する際の形質転換法は, Keszanman-Pereya ら (1988)[62] に従った. 導入後, Trp+となるコロニーを選択した.

2-2-5 抗原タンパク質の調製

a. Mic60(83-54)の調製

pET19b/Mic60(83-540)のプラスミドを用いて, 大腸菌 Rosetta (DE3) に導入した. 得られた形質転換体を 4 L の LB + amp 培地に植菌し, 37°C で OD_{660} =約 0.6 まで培養した. そのうち, 終濃度 1 mM となるように IPTG を加え, 16°C で一晩培養し, 発現を誘導した. 発現誘導後, $1700 \times g$, 4°C で 15 分間の遠心を行い, 大腸菌を集菌した. この大腸菌を 40 ml の TBS300 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl) に懸濁した後, -30°C で凍結させた.

凍結した大腸菌懸濁液を流水中で解凍した後, 100 ml になるように 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl を加えた. このサンプルに, Triton X-100 を 1 ml 加え, 超音波破碎機 Ultrasonic Processor Astrason (Heat Systems) を用いて 1 秒 on, 1 秒 off, 出力 8.0 で 5~10 分間, 菌体を破碎した. 破碎後, $6,000 \times g$, 室温で 10 分間の遠心を行った. 得られた沈殿を 0.1% (v/v) Triton X-100 を含む DW によって懸濁し, $6,000 \times g$, 室温で 10 分間の遠心を行った. 0.1% (v/v) Triton X-100 で洗う同様の操作を計 3 回行ったのち, 0.01% (v/v) Triton X-100 を含む DW によって懸濁し, $6,000 \times g$, 室温で 10 分間の遠心を行った. 0.01% (v/v) Triton X-100 で洗う操作も計 3 回行った. 0.01% (v/v) Triton X-100 で溶かしたサンプルを $6,000 \times g$, 室温で 10 分間の遠心を行い, この沈殿を DW に溶かした. 再び同様の遠心を行ったのち, 沈殿に 8 M 尿素を含む DW を入れ, 一晩放置し, 溶解させた. この上清を回収し, 濃度が 4mg/ml となるように 8 M 尿素を含む DW で希釈し-30°C で保存した.

b. MBP-Mic12 の調製

pCold-GST/Mic12 のプラスミドを用いて, 大腸菌 Rosetta (DE3) に導入した. 得られた形質転換体を 4 L の LB + amp 培地に植菌し, 37°C で OD_{660} =約 0.6 まで培養した. そのうち, 終濃度 1 mM となるように IPTG を加え, 16°C で一晩培養し, 発現を誘導した. 発現誘導後, $1700 \times g$, 4°C で 15 分間の遠心を行い, 大腸菌を集菌した. この大腸菌を 40 ml の TBS300 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl) に懸濁した後, -30°C で凍結させた.

破碎した溶液を遠心機で $10,000 \times g$, 4°C で 20 分間の遠心を行い, 上清と沈殿に分離した. 上清を回収し, 0.45 μ m のフィルター (Miller-HV Filter 0.45 μ m PVDF (Millipore)) で濾過した. ベッド体積 10 ml の Ni-NTA agarose (Qiagen) カラムを 50 ml の平衡化 Buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole-HCl pH 7.4) で平衡化したのち, フィルターにかけたサンプルを全量カラムにかけた. カラムを 50 ml の wash Buffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole-HCl pH 7.4) で洗浄したのち, 15 ml の溶出 Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole-HCl) により結合したタンパク質を溶出した. この溶

出したタンパク質溶液を、濃度が 4mg/ml 程度となるように希釈し、-30°C で保存した。

2-2-6 ウサギへの免疫

抗体を作成するために、各抗原に対し 2 羽の日本白垂種、メス、体重約 2 kg のウサギを用いた。

a. プレ採血および免疫前血清の作製

免疫前のウサギに対し、1 羽あたり 10 ml 程度採血をし、このサンプルを 4°C で一晩インキュベートした。37°C で 2 時間のインキュベートを行い、 $2,500 \times g$, 4°C で 10 分間の遠心を行い、得られた上清を免疫前血清とし-80°C で保存を行った。

b. 免疫および採血

2-2-4 で得た 4 mg/ml の抗原 800 μ l に、アジュバンドである TiterMax Gold (フナコシ) 800 μ l を加え、15 秒間のボルテックスを行った。ボルテックス後、2 本つないだシリンジを用いて十分に混合することで、エマルジョンを作成した。作成したエマルジョンを、ウサギ 1 羽あたり 700 μ l 皮内注射した。免疫から 2 週間後に再び同様の皮内注射を行った。同様の操作をもう 1 度行い、計 3 回の免疫を行った。3 回目の免疫の 1 週間後に、ウサギ 1 羽あたり 10 ml の採血をした。採血後、免疫前血清の作製と同様の操作を行い、抗血清を得た。この抗血清を、2-2-6 の方法で調製した酵母破碎液および膜画分のサンプルを用いて、2-2-14 の方法でウェスタンブロットティングを行うことで、抗体価の確認を行った。抗体価が不十分であった MBP-Mic12 は、再び同様の操作で、免疫、抗血清の作製、抗体価の確認を行った。抗体価が十分であると確認後、ウサギ 1 羽に対して 50 ml の採血を行い、抗血清を作製、-80°C で保存した。

2-2-7 膜分画

酵母細胞を、30°C. SCLac(-Trp)の液体培地で、OD₆₀₀= 1.0 付近まで培養した。この酵母細胞液 20 ml を、 $2,500 \times g$ 、室温で 5 分間の遠心により集菌した。この沈殿を 4 ml の Tris-SO₄ Buffer (100 mM Tris-SO₄ pH 9.4, 10 mM DTT) で細胞を懸濁し、30°C で 15 分間のインキュベートを行った。その後、 $2,500 \times g$, 4°C で 5 分間遠心し、得られた沈殿を 2 ml の Sorbitol buffer (1.2 M sorbitol, 20 mM Tris-HCl pH 7.4) で洗浄した。洗浄した沈殿を再び 2 ml の Sorbitol buffer で懸濁したのち、2 unit/ml の Zymolyase®-20T (Nacalai tesque) を添加し、30°C で 45 分間インキュベートした。その後、 $2,500 \times g$, 4°C で 5 分間遠心し、得られた沈殿を 2 ml の氷冷した Sorbitol buffer に懸濁した。その後、 $2,500 \times g$, 4°C, 5 分間の遠心で回収した沈殿を、500 μ l の Lysis Buffer (0.7 M sorbitol, 20 mM MOPS-KOH pH 7.2, 20 mM MgCl₂, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)) で沈殿を懸濁したのち、200 μ l のガラスビーズを加えた。低温室で 1 分間連続してボルテックスを行い、1 分間静置したのち、再びボルテックスを行うことで、細胞を破碎した。ガラスビーズに付着した残りの細胞破碎液は 200 μ l の Lysis Buffer で再懸濁し、600 μ l の上清を回収した。1,000 $\times g$, 4°C で 5 分間遠心し、上清 300 μ l を新しい

エッペンドルフチューブに移し替え、そのうちの 150 μ l を 75 μ l の 3 \times SDS-PAGE sample buffer を添加し、95 $^{\circ}$ C で 5 分間の熱処理を行い、全細胞破碎液とした。残りの 150 μ l を 15,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。この沈殿に 300 μ l の Lysis Buffer を加え懸濁し、15,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心することで沈殿を洗った。遠心後、沈殿に 225 μ l の SDS-PAGE sample buffer を添加し、超音波処理によって沈殿を懸濁した。95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱処理を行い、膜画分とした。

2-2-8 酵母からのミトコンドリアの単離

酵母からのミトコンドリアの単離は Daum ら (1982) [63]に従って行った。各酵母株を 1 L の YPG あるいは Lactate 液体培地中に植菌し、OD₆₀₀ = 約 1.0 まで培養した。培養後、6,000 \times g , 室温, 3 分間の遠心で集菌した。沈殿を 200 ml の Tris-SO₄ Buffer (100 mM Tris-SO₄ pH 9.4, 10 mM DTT) に懸濁後、培養温度の水浴で 20 分間振とうした。6,000 \times g , 室温, 3 分間の遠心で集菌し、沈殿を 100 ml の Sorbitol Buffer (1.2M sorbitol, 20 mM Kpi pH7.4) に懸濁した。懸濁後、6,000 \times g , 室温, 3 分間の遠心で沈殿を再回収することで洗浄した。回収した菌体の湿重量 10 g あたり 50 mg の Zymolyase[®]-20T (Nacalai tesque) を含む 30 ml の Sorbitol Buffer に懸濁し、培養温度の水浴で 30 分間振とうし、細胞をスフェロプラスト化した。スフェロプラストを 2,000 \times g , 4 $^{\circ}$ C, 5 分間の遠心で回収後、40 ml の Sorbitol Buffer で洗浄した。沈殿を 30 ml の Breaking Buffer (600 mM sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 % (w/v) BSA, 1 mM PMSF) に懸濁し、25 ストロークのホモジナイズにより細胞を破碎した。細胞破碎液を 1,500 \times g , 4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し、未破碎の細胞および核画分を分離した。ミトコンドリア画分を含む上清を回収し、再び 1,500 \times g , 4 $^{\circ}$ C で 10 分間の遠心を行い、1 回目の遠心で分離しきれなかった未破碎の細胞および核画分を分離した。この上清を 13,000 \times g , 4 $^{\circ}$ C, 10 分間遠心し沈殿を回収した。沈殿を 40 ml の SEM Buffer (250 mM sucrose, 10 mM MOPS-KOH pH 7.2, 1 mM EDTA) で洗浄後、再び 13,000 \times g , 4 $^{\circ}$ C, 10 分間遠心した。この沈殿を SEM Buffer に再懸濁し、単離ミトコンドリア画分とした。なお、単離ミトコンドリアは液体窒素で凍結後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

2-2-9 ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* タンパク質合成

a. 単離ミトコンドリアへのタンパク質取り込み実験

前駆体タンパク質を *in vitro* で合成した。まず、目的のタンパク質を発現するために pGEM4Z/X あるいは pTNT/X (X:目的タンパク質) を鋳型としてプライマー SP6-F, SP6-R あるいは pTNT-F, pTNT-R を用いた PCR 反応を行い、SP6 プロモーター下に遺伝子 X をもつ DNA 断片を増幅した。このときの PCR 反応には KOD-plus- (東洋紡) を使用し、50 μ l のスケールで、30 サイクルの PCR 反応を行った。その後、DNA 断片を illustra[™] GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification System (GE Healthcare Bio-Science) を用いて精製した。溶出は、50 μ l の PCR 産物をに対し、25 μ l の DEPC milli-Q で行った。PCR によって得られた DNA 断片を鋳型とし (mRNA 合成反応液 10 μ l あたり DNA 断片溶液を 1 μ l 使用) , SP6 RNA

polymerase (当研究室で調整) により, 37°C で 60 分間転写反応を行うことで目的のタンパク質をコードする mRNA を合成した[64,65]. その後, この mRNA とウサギ網状赤血球ライセート (当研究室で調整) を用い, [³⁵S]-methionine (Easy Tag Express Protein Labeling Mix (Perkin Elmer)) 存在下で, 30°C で 60 分間の翻訳反応を行うことで, 目的のタンパク質を合成した [65,66].

b. *in vitro* ミリスチル化検定

RI ラベルしたタンパク質 (Mic19(WT)-FLAG, Mic19(G2A)-FLAG or Mic19(Δ20)-FLAG) は, [³H]-ミリスチン酸 (Perkin Elmer) あるいは[³⁵S]-methionine 存在下で, ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* タンパク質合成系により行われた. 合成産物 50μl を 950 μl の lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.5% TritonX-100, 0.5 mM EDTA and 1 mM PMSF) と混合したのち, 20 μl の抗-FLAG M2-agarose (Sigma-Aldrich) を加え 4°C で 2 時間 インキュベートを行い, agarose レジンに吸着させた. インキュベート後, agarose レジンを lysis buffer で 3 回洗ったのち, SDS-PAGE サンプルバッファーを加え 95°C で 5 分加熱することで溶出した. SDS-PAGE サンプルバッファーでの溶出後は, 2-2-16 の方法に従い SDS-PAGE で展開した.

2-2-10 単離ミトコンドリアへの前駆体タンパク質取り込み実験

単離ミトコンドリアを 1.0 mg/ml となるように Import Buffer (250 mM sucrose, 80 mM KCl, 2.0 mM ATP, 2.0 mM methionine, 10 mM MOPS-KOH pH 7.2, 2.0 mM DTT, 2.5 mM KPi pH 7.4, 1% (w/v) BSA, 20 mM NADH, 12 mM creatine phosphate, 120 μg/ml creatine kinase) に懸濁した. インポートの際に, 特定の試薬を加えるものは, ミトコンドリアを Import Buffer に懸濁後に加え, 氷上で 10 分静置した. インポート反応は, 反応液を特定の温度 (25°C, 30°C あるいは 37°C) で 2 分間プレインキュベートしたのち, 反応液 100 μl あたり, 10 μl の *in vitro* 合成タンパク質を加えることで開始させた. 一定時間インキュベートした後, 氷冷 SEM Buffer で 5 倍に希釈・氷上に移すことで反応を停止させた. SDS-PAGE でミトコンドリア内に取り込まれた RI ラベルタンパク質を検出する際には, 反応液に終濃度 50 mg/ml となるように proteinase K を加え, 氷上に 20 分間置くことで, ミトコンドリアに取り込まれなかった前駆体タンパク質を消化した. その後, 終濃度 1 mM となるように PMSF を加えることで, プロテアーゼ消化反応を停止させた. 13,000 × g, 4 °C, 5 分間の遠心でミトコンドリアを回収し, 1 mM PMSF を含む SEM Buffer 200 μl で洗浄した. その後, 13,000 × g, 4 °C, 5 分間の遠心でミトコンドリアを再度回収し, SDS-PAGE サンプルバッファーに懸濁した後, 2-2-16 の方法に従い SDS-PAGE で展開した. 取り込み反応後に, Triton X-100 を加える場合には, proteinase K の処理を行った後, 2-2-10 の方法に従い TCA 沈殿を行った. 1 MDa 以上の巨大複合体を検出できる BN-PAGE である, Blue native electrophoresis (BNE) を行う場合には, 200 μl の SEM Buffer (+ 1 mM PMSF) で洗浄後のミトコンドリアを, 2-2-17 の手順に従い処理した.

2-2-11 TCA 沈殿によるタンパク質の回収

タンパク質溶液に、終濃度 0.025% (w/v) となるようにデオキシコール酸ナトリウム溶液を加え、その後、終濃度 10% (v/v)となるように TCA を加え、氷上で 20 分間静置した。20,000 × g , 4 °C, 15 分間の遠心により回収した沈殿を、氷冷したアセトンで洗浄した後、20,000 × g , 4 °C, 15 分間の遠心により沈殿を回収し、タンパク質画分とした。

2-2-12 アルカリ抽出による局在化解析

in vitro タンパク質取り込み反応後、前駆体タンパク質を消化し PMSF でプロテアーゼ反応を停止させた。この溶液を 13,000 × g , 4 °C, 5 分間の遠心を行うことでミトコンドリアを回収し、1 mM PMSF を含む SEM Buffer 200 µl で洗浄した。その後、13,000 × g , 4 °C, 5 分間の遠心でミトコンドリアを再度回収した。遠心で回収したミトコンドリアを 100 µl の 20 mM HEPES-KOH pH 7.2 で懸濁したのち、100 µl の 200 mM Na₂CO₃ (終濃度 100 mM Na₂CO₃) を加えて 15 秒間ボルテックスをおこなったのち、氷上で 30 分間静置した。こののち超遠心 (100,000 × g , 30 分間, 4 °C) にかけて上清と沈殿に分けた。上清は 2-2-11 の方法に従って TCA 沈殿を行った。このとき、アルカリ抽出を行う前のサンプルをトータル画分として保存した。

2-2-13 単離ミトコンドリアを用いた共免疫沈降実験

a. SDS-PAGE を用いた解析のためのサンプル調整

ミトコンドリア 1 mg を 1 mL の 1% Digitonin 入り Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 10% (w/v) Glycerol, 1 mM EDTA, and 1mM PMSF) に懸濁し 30 分間氷上で静置し可溶化を行った。これを 10,000 ×g, 5 分, 4 °C で遠心し上清を回収し、全量を 50 µl の抗 FLAG(M2)-agarose と混合し 4°C で 14 時間インキュベートを行った。インキュベートののち遠心を行い、agarose に結合していないタンパクを取り除き、1 mL の 1% Digitonine 入り Lysis buffer で 3 回洗いを行った。これに 100 µL の SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、95°C で 5 分加熱することで溶出をおこなった。SDS-PAGE サンプルバッファーでの溶出後は、2-2-16 の方法に従い SDS-PAGE で展開した。

b. 二次元電気泳動を用いた解析のためのサンプル調整

ミトコンドリア 60 mg を 9 mL の 1% Digitonin 入り Lysis buffer に懸濁し 30 分間氷上で静置し可溶化を行った。これを 10,000 ×g, 5 分, 4 °C で遠心し上清を回収し、全量を 50 µl の抗 FLAG(M2)-agarose と混合し 4°C で 14 時間インキュベートを行った。インキュベートののち遠心を行い、agarose に結合していないタンパクを取り除き、1 mL の 1% Digitonine 入り Lysis buffer で 3 回洗いを行った。これに 100µL の Digitonine 入り BN-PAGE 用 Lysis buffer を加えたのち、3 µg の 3×peptide を加え、1 時間の rotate を行い溶出した。溶出後、遠心を行うことで上清を回収した。この上清に 20×BN-PAGE 用 sample buffer を加え BN-PAGE 用サンプルと

した(BNE の 1 レーンに用いるサンプル量は 30 μ l である)。

2-2-14 Mia40-FLAG と Mic19C146S/C157S との共免疫沈降実験

RI で標識した Mic19C146S を, 2-2-10 の方法に従い, Mia40-FLAG 株から単離したミトコンドリアと混合し 25°C で 30 分間インキュベートを行った。取り込み反応後, 50 mM 2-iodoacetamide (IAA)を含む SEM バッファーを 500 μ l 加え反応を停止させた。このサンプルを 20,000 \times g, 4°C で 10 分間遠心を行い, ミトコンドリアを SEM バッファーに懸濁することで洗いを行った。再び 20,000 \times g, 4°C で 10 分間遠心を行ったのち, 沈殿を, 1%ジギトニンを含む 200 μ l の solubilization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 1mM PMSF, 50 mM IAA) に懸濁, 氷上で 30 分間静置することで可溶化をおこなった。可溶化後, このサンプルを 20,000 \times g, 4°C で 5 分間遠心を行い, 上清を回収した。この上清に 800 μ l の solubilization buffer と 10 μ l の抗-FLAG M2-agarose を加え, 4°C で 2 時間インキュベートを行い, agarose レジンに FLAG タグ融合タンパク質を吸着させた。吸着反応後, agarose レジンを 1 ml wash buffer (0.2% digitonin, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM IAA, and 1 mM PMSF) で 3 回洗った。これに 20 μ L の 5 M 尿素を含み β メルカプトエタノールを含まない SDS-PAGE サンプルバッファーを加え, 95°C で 5 分加熱することで溶出をおこなった。

2-2-15 Mic19-FLAG と精製 Tom20^{Sol}-His との共免疫沈降実験

Tom20 のサイトゾルドメインに His タグを付加した精製したタンパク質は当研究室の河野慎博士により供与していただいたものを用いた。

精製タンパク質の Tom20^{Sol}-His を 10 μ l の Ni-NTA resin (QIAGEN) と混合し, 4 °C で 1 時間インキュベートすることで吸着させた。この際に加える Tom20^{Sol}-His の量を 0, 0.1, 0.2, 0.5 μ g とし異なる量の Tom20^{Sol}-His が吸着したレジンを得た。吸着反応中に, 1 mg のタンパク量の単離ミトコンドリアを 1% digitonin 入りの 200 μ l solubilization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, and 1 mM PMSF) で懸濁し, 氷上で 30 分間静置し可溶化を行った。可溶化後, 20,000 \times g, 4°C で 5 分間遠心を行い, 上清を回収した。この上清を 10 μ l の Tom20^{Sol}-His を吸着したレジンと混合し, 4°C で 14 時間インキュベートをした。インキュベート後, このレジンを 1 ml の wash buffer (1% digitonin, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, 1 mM PMSF and 50 mM imidazole)を用いて 3 回洗ったのち, 結合したタンパク質を 30 μ l の elution buffer (0.2% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 10% (w/v) glycerol, 1 mM PMSF and 500 mM imidazole)を加えることにより溶出した。このサンプルを SDS-PAGE に用いた。

2-2-16 SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli (1970) [67] に従って行った。また, 膜タンパク質の解析には, 5M

尿素を加えたゲルを用いて、通常の SDS-PAGE と同様の操作を行った。

2-2-17 Blue native electrophoresis (BNE)

Blue native electrophoresis (BNE) は 1000 kDa 以上の巨大複合体を検出できる BN-PAGE である。本研究では 2010 年に Strecker らによって報告された方法に従って、ゲルの作製および泳動を行った [68]。

a. ゲルの作製

分離ゲルは、194 g のモノアクリルアミドと 6 g のビスアクリルアミドを混合し DW で 500 ml にメスアップした 40% アクリルアミド溶液を用いて作成した、3-12% のグラジエントゲルを使用した。また、濃縮ゲルの作製には 18.75 g のモノアクリルアミドと 6.25 g のビスアクリルアミドを混合し DW で 100 ml にメスアップした、20C アクリルアミド溶液を使い作成した 2.5 %ゲルを用いた。なお、濃縮ゲルとコームの間は 3 mm 程度となるようにした。ゲルが固まったのち回収し、4℃ に保存した。

b. サンプル調整およびゲルを用いた展開

サンプルを、32 μ l の Digitonin Buffer (1% (w/v) digitonin, 25 mM imidazole-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 50 mM 6-aminohexanoic acid, 1 mM EDTA, 7.5% (w/v) glycerol) に混合し、氷上で 15 分間静置して可溶化を行った。20,000 \times g , 4℃ で 10 分間遠心し、上清を回収し、32 μ l の上清に対して 8 μ l の 5 \times BN-Sample Buffer (1% (w/v) CBB G250, 25 mM 6-aminohexanoic acid, 1% (w/v) digitonin, 25 mM imidazole-HCl pH 7.0, 50 mM NaCl, 50 mM 6-aminohexanoic acid, 1 mM EDTA, 7.5% (w/v) glycerol) を添加し、BNE ポリアクリルアミドゲル で 250 V, 7 mA の条件下で 200 分間の電気泳動を行い、タンパク質複合体を展開した。電気泳動には、陽極バッファ (50 mM Tricine, 75 mM imidazole-HCl pH 7.0, 0.05% (w/v) CBB G-250) と、陰極バッファ (15 mM imidazole-HCl pH 7.0) を用いた。

2-2-18 タンパク質の検出

a. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行う場合は、ゲル中のタンパク質を Transfer Buffer (10 mM Tris, 192 mM glycine, 5% methanol) を用いたセミドライ式転写により、PVDF 膜 (Immobilon-P™ Transfer Membranes (Millipore) または Immobilon-FL™ Transfer Membranes (Millipore)) へ転写した。2% BSA (脂肪酸フリー) (Nacalai tesque) を含む TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% (w/v) Tween20) で 30 分間ブロッキング後、PVDF 膜を 2% BSA (脂肪酸フリー) と適切な 1 次抗体 (Table.5 参照) を含む TBS-T 溶液に浸し、4℃ で一晩反応させた。一次抗体の反応後 PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、抗原タンパク質と結合していない一次抗体を除去した。2% BSA と二次抗体 (Table.5 参照) を含む TBS-T 溶液に浸し、1 時間反応させた。その後、PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、一次抗体と未結合

の二次抗体を除去した。洗浄後、PVDF膜を乾燥させた。蛍光シグナルの検出には Storm 860 image analyzer (Molecular Dynamics) , または Typhoon 9200 (GE healthcare) で検出を行った。

b. ラジオイメージング

ラジオイメージングで検出を行う場合、SDS-PAGE ゲルあるいは BNE ゲルを Staining Solution (0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 25% (v/v) methanol, 7.5% (v/v) acetic acid) 中に振とうすることで染色し、その後、Destaining Solution (30% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) で脱色した。その後、ゲルをろ紙上に乾燥させ、Imaging Plate (Fujifilm) に露光後、Typhoon 9200 (GE healthcare) で検出した。

3.結果

3.1 MICOS 複合体構成因子の外膜通過後のミトコンドリアの各区画への輸送機構の検討

MICOS 複合体を構成する因子は、出芽酵母では 6 種類が報告されている。このうち Mic19 膜間部側から MICOS 複合体に結合する表在性の内膜タンパク質であり、Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, Mic60 は内在性の内膜タンパク質である。膜間部および内膜に存在するタンパク質は、TOM 複合体を利用して外膜を透過した後、内膜および膜間部への輸送を担う膜透過装置に引き渡され、各区画へと運ばれる。そこでまず単離ミトコンドリアへの *in vitro* インポート実験により、これらの MICOS 複合体構成因子が、外膜透過後にどの内膜あるいは膜間部への輸送を担う膜透過装置によって、既存の MICOS 複合体へと組み込まれるかを検討した。

3.1.1 内膜に局在する MICOS 複合体構成因子の輸送は膜電位に依存する。

ミトコンドリア内膜の内在性膜タンパク質の輸送と膜への組み込みには、内膜の膜透過装置の TIM22 複合体あるいは TIM23 複体のいずれかが関与する。そこでまず、MICOS 複合体構成因子のミトコンドリアへの輸送に、TIM22 複合体もしくは TIM23 複体が関わるかどうかを、*in vitro* インポート実験により検討した。TIM22 複合体と TIM23 複合体によるミトコンドリア内膜への輸送には、いずれも内膜の膜電位 ($\Delta\Psi$) が必要である。そこでこれらの因子の単離ミトコンドリアへのインポートが膜電位に依存するかどうかを調べた。

^{35}S -メチオニン存在下、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で合成した各 MICOS 複合体構成因子前駆体を、出芽酵母から単離したミトコンドリアとインキュベートした。ミトコンドリア内に取り込まれなかった前駆体を proteinase K (PK) で分解した後、SDS-PAGE とラジオイメージングでミトコンドリア内に取り込まれた前駆体を検出・定量した。単離ミトコンドリアに K^+ イオン特異的イオノフォアであるバリノマイシンを加えて内膜の膜電位を消失させた条件 ($-\Delta\Psi$) と、膜電位が存在する条件 ($+\Delta\Psi$) でのミトコンドリアへの取り込み量の比較を行った (図 6)。インキュベーション時間を変えて取り込みの速度を比較すると、内在性内膜にタンパク質である Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, Mic60 は、膜電位がある場合に比べ膜電位を消失した場合は、ミトコンドリアへの取り込み速度が減少した。しかし、Mic60 では膜電位がないときは取り込みが完全に阻害されるのに対して、Mic10, Mic12, Mic26, Mic27 では膜電位がなくてもある程度ミトコンドリアへの取り込みが見られた。また、Mic60 ではミトコンドリア内への取り込みに伴い、分子量の低下が見られたが、これはプレ配列の切断によるものと考えられた。一方表在性内膜タンパク質の Mic19 のインポートでは、膜電位の低下による取り込み速度の低下は見られなかった。なお、*in vitro* タンパク質インポート実験の後に、Triton X-100 を終濃度 1% (v/v) となるように加えてミトコンドリアを可溶化してから PK 処理を行うと、すべての MICOS 複合体構成因子で、バンドが消失した (図 7) ことから、PK 消化に耐性のバンドは PK 耐性の凝集体等ではなく、ミトコンドリア内に取り込まれることで PK 耐性となったことを確認した。

次に、MICOS 複合体構成因子のうち内在性膜タンパク質がミトコンドリアへの取り込み後、膜に正しく組み込まれるかについて評価を行った (図 8)。一般に生体膜をアルカリ (Na_2CO_3) で処理すると、内在

性膜タンパク質は抽出されないが、表在性膜タンパク質は遠心により、上清に抽出される。アルカリ抽出後、コントロールとしてミトコンドリアの可溶性タンパク質の膜タンパク質をウェスタンブロッティングで検出したところ、外膜の β バレル型膜タンパク質の Tom40, 外膜の 1 回膜貫通型タンパク質の Tom20, 内膜の複数回膜貫通タンパク質の

Tim23 は、いずれもアルカリ抽出後の遠心で沈殿(P)に回収されるが、マトリックスの可溶性タンパク質の Hsp60 や、内膜の表在性膜タンパク質の $F_1\beta$ は上清(S)に回収された(図 8A)。一方、*in vitro* でミトコンドリアにインポートした MICOS 構成因子の Mic10, Mic12, Mic26, Mic27 は、いずれもアルカリ抽出後の遠心で沈殿に回収され、内在性膜タンパク質としての特徴を示した。したがって、Mic10, Mic12, Mic26, Mic27 は、*in vitro* タンパク質取り込み実験でも内膜へと正しく組み込まれることがわかった。

次に、ミトコンドリアへと輸送された MICOS 複合体構成因子が、MICOS 複合体に組み込まれるかどうかを確認するため、Mic10, Mic12 について、*in vitro* でミトコンドリアにインポートした後、ジギトニンでミトコンドリアを可溶化し、native 条件での電気泳動、Blue-native Electrophoresis (BNE)により展開し、MICOS 複合体と同様大きな超複合体に移行するかどうかの確認を行った(図 9)。Mic10 のインポートでは、約 1000 kDa, 約 850 kDa, 約 200 kDa, 約 100 kDa のバンドが見られ、Mic12 では約 1000 kDa と約 850 kDa のバンドが見られた。Mic10 は約 200 kDa のホモオリゴマーを作ること[7]、MICOS 複合体は約 1000 kDa と約 800 kDa の 2 つのバンドを示すことが報告されている [5]。したがって、Mic10 と Mic12 は、単離ミトコンドリアへの *in vitro* インポート後、MICOS 複合体に正しくアセンブリーされるものと考えられる。

以上の結果から、内在性内膜タンパク質 Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, Mic60 のミトコンドリアへの輸送は膜電位に依存すること、そして表在性内膜タンパク質の Mic19 の輸送には膜電位は必要ではないことが明らかとなった。

3.1.2 MICOS 複合体構成因子の輸送は TIM22 複合体には依存しない

内在性内膜タンパク質 Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, Mic60 の輸送が膜電位に依存することから、これらの輸送に TIM22 複合体か TIM23 複体のいずれかが関与することが示唆された。そこで、これら 2 つの可能性を区別するために、TIM22 複体の膜透過チャネルを作る Tim22 のタンパク量を減少させたミトコンドリアでは、これらの因子の輸送に影響があるかどうかを調べた。Tim22 は細胞の増殖に必須なので、TIM22 欠失株を使うことはできない。そこで Tim22 のタンパク量を減少させたミトコンドリアを単離するために、Tim22 の遺伝子上流に GAL7 プロモーターを導入した株 (GAL-TIM22) [56]を用いた。GAL7 プロモーターの制御下の遺伝子は、ガラクトース培地では発現誘導がかかるが、ガラクトースを含まない炭素源であるグルコース培地等では発現が抑制される。したがって、GAL-TIM22 株を培養する培地をガラクトース含有培地からグルコース含有培地にシフトして、Tim22 の発現を抑制した後でミトコンドリアを単離することにより、Tim22 のタンパク量が減少したミトコンドリアを得た (Tim22↓)。培地のシフトによりミトコンドリア内の Tim22 のタンパク量が減少していることを確かめるため、ウェスタンブロッティングにより Tim22 を検出したところ、野生型 (WT) から単離したミトコンドリアと比べて Tim22↓ミトコンドリアではバンドの強度が ??% 以下に低下していた(図 10)。このとき TIM22 複合体構成因子

の Tim54, TIM23 複合体構成因子の Tim23, MIA40/TIM40 経路の Mia40, TOM 複合体構成因子の Tom70, Tom20 のいずれも, タンパク質量が減少していないことをウェスタンブロッティングで確認した. 野生型株から単離した野生型 (WT) ミトコンドリアと Tim22↓ミトコンドリアを用いて, MICOS 複合体構成因子の *in vitro* タンパク質インポート実験を行い, インポート速度の比較を行うことで, MICOS 複合体構成因子の輸送が TIM22 複合体に依存するかどうかを検討した. コントロールとして, TIM23 複合体により輸送され, TIM22 複合体に輸送が依存しない Su9-DHFR では, WT でも Tim22↓でもミトコンドリアへのインポート速度に差は見られないが (図 11 A), TIM22 複合体により輸送されることが知られている AAC では Tim22↓でインポート速度の減少が見られた (図 11 B). MICOS 複合体構成因子 6 種の前駆体のインポート速度を WT ミトコンドリアと Tim22↓ミトコンドリアで比較したところ, すべての因子で差は見られなかった (図 12). 以上の結果から, MICOS 複合体構成因子のミトコンドリアへの輸送には TIM22 複合体は関与していないことが示された.

3.1.3 内膜に局在する MICOS 複合体構成因子の輸送は TIM23 複合体に依存する.

MICOS 複合体構成因子の輸送が TIM23 複合体に依存するかどうかを調べるために, TIM23 複合体の必須サブユニットの機能低下変異体をもつ *tim50-279,282,286* 株 [27] と野生型株 (*TIM50*) からミトコンドリアを単離した. *tim50-279,282,286* 株では Tim50 が膜間部で Tim23 と相互作用する領域に変異があり, *in vitro* タンパク質取り込み実験を行うと, 野生型ミトコンドリアに比べて TIM23 複合体による輸送速度を低下させることが知られている [27]. *TIM50* 株と比較して *tim50-279,282,286* 株から単離したミトコンドリアで膜透過装置のタンパク量に影響がないことを, ウェスタンブロッティングで確認した (図 13). これらのミトコンドリアを用いて, *in vitro* タンパク質取り込み実験を行った. 輸送が TIM23 複合体ではなく TIM22 複合体に依存する Tim23 ではインポート速度の差は見られず (図 14 A), TIM23 複合体によりマトリクスへと輸送される Su9-DHFR では *tim50-279,282,286* ミトコンドリアでインポート速度の低下が見られた (図 14 B). 6 種の MICOS 複合体構成因子前駆体について, *TIM50* ミトコンドリアと *tim50-279,282,286* ミトコンドリアへの取り込み実験を行ったところ, プレ配列をもつ内在性内膜タンパク質の Mic60 では *tim50-279,282,286* ミトコンドリアへのインポート速度が大きく減少し, プレ配列を持たない内在性内膜タンパク質の Mic10, Mic12, Mic26, Mic27 でも, *tim50-279,282,286* ミトコンドリアへのインポート速度が 1/3 から 1/2 程度減少した (図 15). これに対して, 表在性内膜タンパク質の Mic19 では *TIM50* ミトコンドリアと比較して *tim50-279,282,286* ミトコンドリアへのインポート速度は変化しなかった. したがって, Mic19 以外の 5 種類の MICOS 複合体構成因子前駆体のミトコンドリアへの輸送は, TIM23 複合体に依るものであることが示唆された.

Mic60 は *in vitro* インポートが膜電位および Tim50 に大きく依存するとともに, N 末端に両親媒性ヘリックスを形成し, インポート後切断されるプレ配列を持つことが *in vitro* インポート実験で確認された. またプレ配列の下流に内膜への仕分けシグナルと考えられる膜貫通配列をもっていることから, CoxV 等と同様, TIM23 複合体からのラテラルリリースにより内膜に直接組み込まれるタイプの輸送が行われていることが示唆される.

Mic10 は, 2 つの膜貫通領域の間のループに存在する正電荷をもつアミノ酸 (K61, R62, R63) をアラ

ニンに置換した変異体 (Mic10 Mut) が *in vivo* でミトコンドリアに局在できなくなることが報告されている [7]. そこで *in vitro* タンパク質取り込み実験でも同様に Mic10 Mut がミトコンドリアに輸送されなくなるかどうかを検討したところ, Mic10 Mut はミトコンドリアにまったく取り込まれなかった (図 16 B). このことから, Mic10 では 2 つの膜貫通領域の間のループに存在する正電荷が輸送シグナルとして働くことが考えられる.

3.1.4 MICOS 複合体構成因子の輸送は SSC1 には依存しない

次に TIM23 複合体を構成しマトリクスへのタンパク質輸送を駆動する Ssc1/mtHsp70 が, MICOS 複合体構成因子前駆体の輸送に関わるかどうかを検討した. Ssc1 は酵母の増殖に必須であるため, Ssc1 の温度感受性変異体を持つ *ssc1-3* 株 [36] から単離したミトコンドリアと野生型株 (SSC1) から単離したミトコンドリアを用いて, 温度感受性株の変異が顕在化する非許容温度 37°C で *in vitro* タンパク質取り込み実験を行った. まず SSC1 株と *ssc1-3* 株からミトコンドリアを単離し, 両ミトコンドリアで膜透過装置のタンパク質量が変わらないことを確認した (図 17). ミトコンドリアへの輸送に Ssc1 を必要としない TIM22 経路の基質 Tim23 では SSC1 株から単離したミトコンドリアでも *ssc1-3* 株から単離したミトコンドリアでもインポート速度は変化しなかったが (図 18 A), TIM23 経路でマトリクスに輸送される際に Ssc1 によるアンフォールディングと引き込み力を必要とする Su9-DHFR では *ssc1-3* ミトコンドリアでインポート速度が減少した (図 18 B). 6 種の MICOS 複合体構成因子前駆体の *in vitro* タンパク質取り込み実験を行ったところ, すべての因子で SSC1 から単離したミトコンドリアでも *ssc1-3* から単離したミトコンドリアでも取り込み量は変化しなかった (図 19). したがって, これらの MICOS 複合体構成因子前駆体の輸送には mtHsp70/Ssc1 は関与していないことがわかった. 以上の結果は, Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, Mic60 が, TIM23 複合体による一回膜貫通型内膜タンパク質の輸送経路 (膜電位を必要とするが mtHsp70 を必要としない) を利用するという解釈と一致する.

3.1.5 Mic19 の輸送は Mia40/Tim40 に依存する.

次に, 膜間部の可溶性タンパク質や一部の表在性内膜タンパク質の輸送を行う Mia40/Tim40 が, MICOS 複合体構成因子前駆体の輸送に関与するかどうかを検討した. Mia40 は酵母の増殖に必須なので MIA40 欠失変異体を使うことはできない. そこで Mia40 の基質結合部位の Phe311 を Glu に置換緩した変異を導入した機能欠損 Mia40 をもつ *mia40-F311E* 株 [51] と野生型の MIA40-WT 株からミトコンドリアを単離した. これらのミトコンドリアを用いて膜透過装置のタンパク質量が変化しないことを確認し (図 20), *in vitro* での前駆体タンパク質のインポート速度の比較を行った. TIM23 複合体にミトコンドリアへの輸送が依存する Su9-DHFR と Mia40 に輸送が依存する Tim9 をコントロールとして用いたところ, Su9-DHFR では MIA40-WT と *mia40-F311E* でインポート速度は変わらず, Tim9 では MIA40-F311E でのインポート速度は大きく減少した (図 21). これらの単離ミトコンドリアを用いて, MICOS 複合体構成因子の取り込み実験を行ったところ, すべての因子で MIA40-WT に比べて *mia40-F311E* でインポート速度が若干低下したが, Mic10, Mic12, Mic27, Mic26, Mic60 ではインポート速度が 2-3 割程度の減少であったのに対して Mic19 ではインポート速度が 4 割程度低下した (図 22).

3.1.6 Mic19 の輸送は還元剤であるジチオスレイトール (DTT) により阻害される.

Mic19 の輸送は他の MICOS 複合体構成因子に比べて Mia40 への依存度が高く, また以前に他のグループからも Mic19 の輸送は Mia40 に依存すると報告されている[12,46]. Mia40 を介したタンパク質の輸送される際においては, 輸送される基質タンパク質は, 膜間部で Mia40 と分子間ジスルフィド結合を介した *mix disulfide intermediate* を作った後, ジスルフィド結合が分子内に移動し, フォールドした構造の安定化が起こり, 外膜を逆戻りすることが防がれる. そこで, *in vitro* タンパク質取り込み実験において, 還元剤 DTT を加えて, Mia40 との間の分子間ジスルフィド結合やタンパク質内でのジスルフィド結合の形成を阻害することで MICOS 複合体構成因子のミトコンドリアへのインポート速度が影響を受けるかどうかを検討した. コントロールとしていて, TIM23 複合体により輸送される Su9-DHFR のインポート速度が DTT を加えても変化しないこと(図 23A), また Mia40 により膜間部に輸送される Tim9 は 7mM 以上の DTT 添加によりミトコンドリアへのインポート速度が減少することを確認した(図 23B). この条件で MICOS 複合体構成因子前駆体のミトコンドリアへのインポート速度が DTT 濃度により変化するかを調べたところ, 内在性内膜タンパク質の Mic10, Mic12, Mic26, Mic27 は速度が変化せず, Mic60 も 20 mM DTT 存在下でも DTT 2 mM 存在下とでインポート速度がほとんど同じであった. 一方, 表在性内膜タンパク質であり, 輸送の Mia40 への依存が強かった Mic19 では, 明かに DTT 濃度依存的なインポート速度の減少が見られた(図 24). 以上の結果から, MICOS 複合体構成因子のうち Mic19 以外の内在性内膜タンパク質の輸送には Mia40 は関わっていないが, Mic19 の輸送には Mia40 が関わると考えた.

3.1.7 Mic19 の輸送には自身のもつシステインが関与する.

上述のように Mia40 によって膜間部へと運ばれるタンパク質は, 輸送途中に Mia40 と分子間ジスルフィド結合を形成する. 分子間ジスルフィド結合は基質のツイン CX₉C モチーフまたはツイン CX₃C モチーフの Cys と Mia40 の活性ジスルフィド結合を形成する Cys296 との間で一過的に形成される. このとき Mia40 の活性ジスルフィド結合に関わるもう一つの Cys298 は還元型になる. 哺乳類の Mic19 では, 輸送途中に, ツイン CX₉C モチーフが Mia40 と分子間ジスルフィド結合を形成することが示されているが, 酵母 Mivc19 では不明である. そこで出芽酵母の Mic19 のアミノ酸配列と配列比較をすると, 出芽酵母の Mic19 でも Mia40 とジスルフィド結合を作りうるシステインが 2 つ含まれることがわかった(図 25 A). そこで, 2 つのシステインを同時にセリンに置換した Mic19 C146S/C157S がミトコンドリアへと運ばれるかどうかを検討するため, *in vitro* タンパク質取り込み実験を行った(図 25 B). この際に, システインをセリンに置換した変異が Mia40 による輸送の前段階(ミトコンドリア表面への結合ステップ)に影響を与えるかどうか調べるため, PK 消化を行わないサンプルの解析も同時に行った. PK 消化を行わなかった場合(-PK)は, Mic19WT に比べて Mic19 C146S/C157S ではミトコンドリアへの結合速度がやや減少していることがわかった. PK 消化を行った場合には, Mic19 C146S/C157S ではインポート速度の顕著な低下が見られた. 以上のことから, Mic19 のシステインはミトコンドリアへの輸送に必要であることが示された.

3.1.8 Mic19 は輸送途中に 157 番目のシステインで Mia40 と分子間ジスルフィド結合を形成する

次に Mic19 が実際に Mia40 と分子間ジスルフィド結合を作ることを確認を行った。そこでまず、Mic19 が自身のシステインに依存して他のタンパク質と分子間ジスルフィド結合を作るかどうかを確かめることにした。一般に分子間ジスルフィド結合を介した mix-disulfide intermediate は一過的にしか存在しないので、それらを安定化するために最終的に分子内ジスルフィド結合をつくる Cys の一方を Ser に置換することにした。すなわち、Mic19 の野生型および各 Cys を Ser に置換した変異体をミトコンドリアに *in vitro* で取り込ませた。取り込まれなかったタンパク質を PK により消化した後、SDS-PAGE で展開する際に、通常の還元条件下 (β メルカプトエタノールを加える) だけでなく、ジスルフィド結合を酸化しない非還元条件下 (β メルカプトエタノールを加えない) での泳動も行った。 β メルカプトエタノールを加えない非還元条件下では、Mic19WT および Mic19 C146S 変異体では分子量が約 75 kDa の位置にバンドが見られたが、Mic19 C157S 変異体や Mic19 C146S/C157S 変異体では見られなかった(図 26 A)。また、約 75 kDa の位置に見られるバンドは β メルカプトエタノールを加えた還元条件下では見られなかったため、67 kDa より高分子にみられるバンドは Mic19 の C157 がジスルフィド結合を介して他のタンパク質と結合したものと考えられる。さらに β メルカプトエタノールを加えない非還元条件下では、Mic19WT の 20 kDa 付近のバンドがやや分子量の低い位置にシフトしていた。これは、Mic19WT は分子内でジスルフィド結合を形成し、非還元条件下ではこのジスルフィド結合が保たれた酸化型、還元条件下ではこのジスルフィド結合が切断された還元型となり、両者の泳動度に若干の差があるものと考えられた。

次に Mic19 の分子間ジスルフィド結合のパートナーが Mia40 であるかどうかを検討した。Mic19 C146S 変異体を Mia40 の C 末端に FLAG タグを付加した Mic40-FLAG を発現する酵母株から単離したミトコンドリアに *in vitro* で取り込ませ、PK 消化を行った(図 26 B)。分子間ジスルフィド結合を形成したと考えられる 75 kDa バンドの位置は、野生型のミトコンドリアを使った場合に比べて、FLAG タグ分(約 3 kDa)だけ高分子量側にシフトした(分子量 約 80 kDa)。TX-100 でミトコンドリアを可溶化し、FLAG タグで精製を行ったところ、分子量が 80 kDa にシフトしたタンパク質のみが検出された。このことから、Mic19 は C157 を介して、輸送途中に Mia40 とジスルフィド結合を介した mix-disulfide intermediate を作ることが明らかとなった。さらに、Mic19WT に比べて Mic19 C146S では mix-disulfide intermediate のバンドが濃かったこと、Mic19WT でのみ Mic19 よりも低分子量である分子内ジスルフィド結合が形成された Mic19 が見られることから、この Mia40 との分子間ジスルフィド結合の解消には Mic19 C157 が C146 と分子内でジスルフィド結合を形成する必要があると考えられた。

3.2 Mic19 の輸送に関与するミトコンドリア膜透過装置の探索

3.1 までの項目で Mic19 の輸送には Mia40 が関わることを、そしてその輸送には Mic19 自身の持つ Cys が必要であることが明らかとなった。しかしながら *in vitro* タンパク質取り込み実験を、Mia40 経路を阻害する還元条件下で行った場合でも、Mic19 のミトコンドリアへの取り込みは Tim9 のように完全に阻害されることはなかった。このことは、Mic19 の輸送には Mia40 以外の膜透過装置も関わっている可能性を示唆するものである。そこで、ここまでの項目で検討してきた TOM 複合体を透過した後に内膜や膜間部への輸送に関与するとされている膜透過装置だけではなく、TOM 複合体のレセプター

(MIA40/TIM40 経路の基質は TOM 複合体のレセプターには依存しないことが知られている)や β バレル型外膜タンパク質の輸送に関与する SAM 複合体などが Mic19 の輸送に関わるかどうかを検討した。

3.2.1 Mic19 のミトコンドリア内への輸送には TOM 複合体のレセプターである Tom20 が関与する

MIA40/TIM40 経路の基質の外膜透過は TOM 複合体の Tom40 チャンネルを介すること, しかし TOM 複合体のレセプターである Tom22 には依存しないことが報告されている[12]. しかし, Mic19 のミトコンドリアへの取り込みが TOM 複合体のレセプター因子である Tom20 や Tom70/71 に依存するかどうかは不明である. そこで Mic19 のミトコンドリア内への輸送に, TOM 複合体のレセプターサブユニットである Tom20, Tom70/71 が関与するかどうかを検討した。

まず Tom20 に輸送が関与するかどうかを調べるために, Tom22 の C 末端に AID タグを導入した株 (*Tom20-AID*-9×Myc*, *Tom20-3 ×mini-AID*)を作成し, Tom20 のタンパク量が減少したミトコンドリアを単離した. 単離したミトコンドリアを用いてウエスタンブロッティングを行い, Tom20 のタンパク質量が減少しておりそのほかの膜透過装置の量が減少していないことを確認した(図 27). このミトコンドリアと野生型のミトコンドリアを用い, コントロール基質である Tim9 の *in vitro* タンパク質取り込み実験を行った(図 28). ミトコンドリアへの輸送が Tom20 に依存しない Tim9 ではインポート速度は WT ミトコンドリアと *Tom20-AID*-9×Myc*, *Tom20-3 ×mini-AID* ミトコンドリアで差がなかった. 一方 Mic19 の *in vitro* タンパク質取り込み実験を行ったところ, WT ミトコンドリアと比較して *Tom20-AID*-9×Myc*, *Tom20-3 ×mini-AID* ミトコンドリアで Mic19 のミトコンドリアへの結合 (-PK) はあまり差が見られなかったが, インポート速度 (+PK) は約半分に減少した(図 29).

次に Tom70 に輸送が関与するかどうかを調べるために, 野生型株から単離したミトコンドリア(WT)と Tom70/71 欠損株[57]から単離したミトコンドリア(*tom70/71Δ*)を用いて, Mic19 のミトコンドリアへの輸送に Tom70/71 が関与するかを調べた. *tom70/71Δ* ミトコンドリアでは Tom70 が確かに欠損していること, WT ミトコンドリアと比べて Tom70 以外の膜透過装置のタンパク量が変化しないことを確認したのち(図 30), *in vitro* タンパク質取り込み実験を行った. コントロールとして, 輸送が Tom70/71 に依存しない Su9-DHFR ではインポート速度が変化せず, また輸送が Tom70/71 に依存する Tim23 ではインポート速度が減少することを確認した(図 31). これらのミトコンドリアを用いて Mic19 の *in vitro* タンパク質取り込み実験を行ったところ, Mic19 のインポート速度は WT ミトコンドリアと *tom70/71Δ* ミトコンドリアで差が見られなかった(図 32). 以上の結果から, Mic19 のミトコンドリアへの輸送には TOM 複合体のレセプター因子のうち, Tom20 が関わっており, そのほかのレセプターは関わっていないことが示された。

3.2.2 Mic19 のミトコンドリアへの輸送に SAM 複合体は影響を与える

SAM 複合体は, 外膜に局在する β バレル型膜タンパク質の膜間部側から外膜への組み込みに関与する膜透過装置である. この SAM 複合体の中心的な役割を担う Sam50 が, Mic19 の輸送に関与するかどうかを検討するため, Sam50 は酵母の増殖に必須なので, TIM22 の場合と同様に *GAL7* プロモータの制御下で Sam50 を発現する株 *GAL-Sam50* 株を作成, この株をガラクトースを含む培地から含まない培地にシフトすることで, Sam50 のタンパク量が減少したミトコンドリア (*Sam50↓*)を単離した. *Sam50↓*ミ

トコンドリアを用いてウエスタンブロッティングを行い、Sam50のタンパク量が減少しており、そのほかの膜透過装置のタンパク量が変化しないことを確認した(図 33)。このミトコンドリアを用い、輸送がSAM複合体に依存しないSu9-DHFRではWTミトコンドリアとSam50↓ミトコンドリアでインポート速度の差はほとんどなく、SAM複合体により外膜への輸送が行われるPor1ではSam50↓ミトコンドリアでインポート速度が著しく減少することを確認した(図 34)。このミトコンドリアを用いてMic19の取り込み実験を行ったところ、WTミトコンドリアを用いた場合と比較してSam50↓ミトコンドリアでは、インポート速度が減少した(図 35)。このことから、Mic19のミトコンドリア膜間部への輸送にはSAM複合体が関与する可能性が示唆された。

3.3 Mic19のN-ミストイル化モチーフが輸送シグナルとして働くかについての検定

哺乳動物細胞においては、Mic19はN末端にミストイル化モチーフMGX₃S(Xは任意のアミノ酸)を持ち、翻訳後にN末端の開始メチオニンが切断されて露出したグリシンにミストイル基が付加されることが知られている[14]。このミストイル化モチーフの二番目のGlyをAlaに置換した変異体やミストイル化モチーフの20残基を欠失した欠損変異体ではミストイル化が起こらず、Mic19のミトコンドリアへの*in vivo*での局在が阻害されることが報告されている[46]。アミノ酸配列を比較すると、出芽酵母のMic19もミストイル化モチーフを持つことがわかった(図 25 A)。しかし、出芽酵母Mic19でもミストイル化が起こり、ミストイル化がMic19のミトコンドリア移行に必要なかどうかは不明である。そこで、酵母Mic19のミストイル化欠損変異体を作成し、これらの変異体の*in vivo*での局在解析および*in vitro*タンパク質取り込み実験を行うことで、ミストイル化がミトコンドリア移行に重要かどうかを調べた。

3.3.1 *in vitro* タンパク質合成実験によるミストイル化の検討

³Hで標識されたミスチン酸存在下で、ウサギ網状赤血球ライセートの無細胞タンパク質合成系を用いてMic19を*in vitro*で合成することにより、Mic19がミストイル化を受けるかどうかを調べた。この際、通常のSDS-PAGE後のラジオイメージングでは³Hの検出感度が十分ではないので、合成後に濃縮を行うためFLAGタグによるアフィニティ精製を行った。FLAGタグが付加されたMic19の野生型(WT)およびミストイル化モチーフの点変異体(G2A)、ミストイル化モチーフ欠損体(Δ20)の合成を行った。コントロールとして³⁵S-メチオニン存在下での*in vitro*合成を行い、合成が実際に行われ、またタグによる濃縮が行われることを確認した(図 36 A)。³Hで標識されたミスチン酸存在下でMic19WT-FLAGを合成した場合には³HのRI由来のバンドが見られ、2種類のミストイル化モチーフ変異体ではバンドは見られなかった(図 36 B)。この結果から、Mic19はN末端に存在するミストイル化モチーフに依存して、*in vitro*でミストイル化を受けることが明らかとなった。

3.3.2 Mic19のN-ミストイル化モチーフ変異体を用いた*in vitro* タンパク質取り込み実験

Mic19のN-ミストイル化がMic19の輸送に関与するかどうかを明らかにするため、Mic19とミストイル化欠損変異体を用いて*in vitro*タンパク質取り込み実験を行った。この際、ミトコンドリア表面への結合への影響も検討するために、PK消化を行わないサンプルの解析も同時に行った。PK消化を行わなかった場合のミトコンドリア内へのインポート速度、PK消化を行わなかった場合のミトコンドリア内への取

り込み＋表面への結合速度のいずれも、野生型 Mic19 はミリストイル化欠損変異体よりも大きかった(図 37). Mic19 WT では基質として加えた量の約 4%がミトコンドリア内あるいは表面に存在し, 1.5 %がミトコンドリア内へと運ばれることがわかった. これに対して, ミリストイル化モチーフの変異体(G2A)および欠損体(Δ 20)では, 基質として加えた量の約 1 %がミトコンドリア内あるいは表面に存在し, 0.5 %がミトコンドリア内へと運ばれた. この結果から, Mic19 の N-ミリストイル化モチーフは, ミトコンドリア表面への結合およびミトコンドリア内への移行の両方を促進することが分かった.

3.3.3 *in vivo* での Mic19 の輸送シグナル解析

次に, Mic19 のミリストイル化モチーフや Cys146 と Cys157 が *in vivo* でもミトコンドリア移行に必要なかどうかを検討した. Mic19 欠損株に, 野生型あるいは各変異体の Mic19 の C 末端に FLAG を付加した融合タンパク質(Mic19-FLAG)を発現させるプラスミドを導入した株を作成し, この株を用いて細胞分画を行い, 各 Mic19 の細胞内局在の解析を行った.

まず各株について, サイトゾル画分と膜画分に分画し, ウェスタンブロッティングで各 Mic19 の局在化解析を行った(図 38). コントロールとして, ミトコンドリア内膜に存在する Tim23 は膜画分(M)に, サイトゾルに存在する Ssb1 はサイトゾル画分(C)に回収され, 膜画分がうまくいっていることを確認した. これらの画分について, FLAG 抗体を用いて Mic19 を検出したところ, 野生型 Mic19 に FLAG を付加した Mic19WT-FLAG では, 約 30 %がサイトゾル画分に, 約 70 %が膜画分に回収されることがわかった. また, Mic19 のミリストイル化モチーフ変異体の Mic19 G2A-FLAG やミリストイル化モチーフ欠損体の Mic19 Δ 20-FLAG, MIA40 経路の輸送に必須の Cys146 と Cys157(以下ではシステインモチーフと呼ぶことにする)を Ser に置換した変異体 Mic19C146S/C157S-FLAG では, 60%以上が膜画分に回収された. これに対して, N-ミリストイル化モチーフとシステインモチーフの両方を変異させた Mic19 G2A/C146S/C157S-FLAG では, 約 70 %がサイトゾル画分に回収され, 膜画分(ミトコンドリア)への局在には N-ミリストイル化モチーフとシステインモチーフの両方が必要であることが示唆された.

さらに膜画分に回収された Mic19-FLAG がミトコンドリア内部に局在するかを調べるため, 単離ミトコンドリアに PK を加えミトコンドリア表面に存在するタンパク質を除去した(図 39). ミトコンドリア外膜に局在しサイトゾルにドメインを持つ Tom20 や Tom70 は PK により完全に消化され, ミトコンドリア外膜の β バレル型膜タンパク質である Tom40 でも大半が PK で消化された. また, ミトコンドリア内膜に存在する Mic60 は消化されなかった. 次に膜画分に回収された各 Mic19-FLAG 変異体がミトコンドリア内へと取り込まれるかどうかについて検討した(図 39). Mic19-FLAG 変異体はすべて, TX-100 で膜を可溶化してから PK 消化を行うと, 大部分が消化されることを確認した. Mic19 WT-FLAG は約 70 %が PK で消化されず, ミトコンドリア内に存在することがわかった. Mic19 の N-ミリストイル化モチーフ変異体(Mic19G2A-FLAG, Mic19 Δ 20-FLAG)でも同等以上の割合のタンパク質がミトコンドリア内へと取り込まれていた. また Mic19 のシステイン変異体である Mic19 C146S/C157S-FLAG では約 50 %がミトコンドリア内へと取り込まれていた. このように Mic19 の変異体のうち N-ミリストイル化モチーフとシステインモチーフのいずれかを単独で欠損させた変異体はすべて, ミトコンドリア内へと取り込まれることがわかった.

以上の膜分画実験および PK 消化実験の結果から、酵母細胞内において、Mic19 のミリストイル化モチーフおよびシステインモチーフは、単独で十分にミトコンドリアへの移行を促すことが示唆された。また先に述べたように、システインモチーフが関わる MIA40/TIM40 経路を阻害する還元条件下で *in vitro* タンパク質取り込み実験を行った場合でも、Mic19 のミトコンドリアへの取り込みは Tim9 のように完全に阻害されることがなかった(図.24)。これらのことから、Mic19 のミリストイル化モチーフは、*in vivo* でも *in vitro* でも Mia40 経路の輸送シグナルであるシステインモチーフと独立して MIA40/TIM40 経路以外の膜透過装置に認識されることが考えられる。

3.3.4 Mic19 と Tom20 との結合実験

Mic19 の N-ミリストイル化モチーフが、Mia40 に認識されるシステインモチーフとは独立に輸送シグナルとして働くことが示されたため、N-ミリストイル化モチーフがどの膜透過装置に認識されるのか検討した。図 29 の結果より、Mic19 の輸送には TOM 複合体のレセプターである Tom20 が関与することが示唆されている。Tom20 はミトコンドリアの外膜に存在し、サイトゾル側にミトコンドリア行シグナルを認識するレセプタードメインを持つ。そこで、この Tom20 のレセプタードメインが Mic19 と N-ミリストイル化モチーフ依存的に相互作用するかどうかを検討した。Tom20 のレセプタードメインの N 末端に His タグを付加した融合タンパク質 His-Tom20^{sol} を Ni-NTA レジンと混合し、Ni-NTA レジンに吸着させた。この Ni-NTA レジンに Mic19-FLAG を発現した酵母株から単離したミトコンドリアを混合し、Ni-NTA アフィニティーによる共沈降実験を行った(図 40)。Mic19 WT-FLAG は、Ni-NTA レジンに His-Tom20^{sol} を吸着させなかった場合にはレジンとほとんど共沈しないが、Ni-NTA レジンに His-Tom20^{sol} を 50 µg 吸着させた場合にはレジンと効率よく共沈した(図 40 A)。一方、Mic19 G2A-FLAG は His-Tom20^{sol} を吸着させた Ni-NTA レジンとの共沈は見られなかった。また、Mic19 WT-FLAG が Ni-NTA レジンと共沈する量は、Ni-NTA に吸着させた His-Tom20Sol の量に依存することもわかった(図 40 B)。この結果と図 29 の結果をあわせて考えると、TOM 複合体のレセプターである Tom20 がのレセプタードメインが Mic19 の N-ミリストイル化モチーフを認識し、その外膜透過を促進すると考えられる。

3.3.5 Mic19 と Sam50 との結合実験

Mic19 のミトコンドリアへの輸送には Sam50 も関与するらしいことが図 35 により示唆された。さらに、哺乳動物において Mic19 は N-ミリストイル化モチーフ依存的に Sam50 と結合することが報告されている。そこで出芽酵母でも、Mic19 の N-ミリストイル化モチーフに依存して Sam50 と結合するかを検討するために、Mic19-FLAG を発現した酵母株から単離したミトコンドリアを用い、FLAG タグでの共免疫沈降実験を行った(図 41)。コントロールとして Mic19 と相互作用し MICOS 複合体をつくる Mic12, Mic60, Mic19 と相互作用しない Tim23 を用いた。抗 FLAG 抗体で Mic19-FLAG を免疫沈降させたところ、Mic12, Mic60 は共沈降されたが、Tim23 は共沈降されなかった。一方 Sam50 抗体で Sam50 の共沈降を検出したところ、Mic19WT-FLAG ミトコンドリアや Mic19C146S/C157S-FLAG ミトコンドリアでは、Sam50 が共沈降したが、Mic19 の N-ミリストイル化モチーフ変異体(Mic19G2A-FLAG)および欠失変異体(Mic19Δ20-FLAG)では Sam50 は共沈降しなかった。以上の結果から、Mic19 のミトコンドリア内へ

の輸送の際にはN-ミristイル化モチーフとSam50が相互作用し、その輸送を促進している可能性が示唆された。ただ、この相互作用が、Sam50のサイトゾル側で起こるのか、膜間部側で起こるのかはわからなかった。前者であればMic19の外膜への結合時にSam50による認識に関わることが考えられるが、後者であれば、ミトコンドリア内への取り込み後にMic19がSam50により認識されることになる。

3.4 N-ミristイル化モチーフが輸送シグナルとして働く条件の探索

これまでの結果から、Mic19のN-ミristイル化モチーフがミトコンドリアへの輸送シグナルとして働くことがわかった。しかし、出芽酵母においてはMic19以外にミristイル化モチーフが輸送シグナルとして報告された例はなく、またMIA40/TIM40経路の基質はすべてシステインモチーフ前後の移行シグナルでミトコンドリア局在が起こると考えられている。そこでMic19のN-ミristイル化モチーフがどのように輸送シグナルとして働くかについて検討することにした。

3.4.1 N-ミristイル化モチーフを持つMdm35の*in vitro*タンパク質取り込み実験。

MIA40/TIM40経路の基質としてミトコンドリアの膜間部に局在し、N-末端にミristイル化モチーフを持つタンパク質としてMdm35を見いだした。そこで、Mdm35のミトコンドリア膜間部への輸送にもMic19と同様にN-ミristイル化モチーフが関与するかどうかについて、検討した(図42)。野生型Mdm35(Mdm35-WT)とミristイル化モチーフ変異体(Mdm35-G2A)を単離ミトコンドリアに*in vitro*で取り込ませ、PK消化を行ったサンプルと行わなかったサンプルを解析した。Mdm35-WTと比較して、Mdm35-G2AではPKのときに見られるミトコンドリア表面への結合速度は増大していたが、PK消化耐性となったミトコンドリア内へのインポート速度については、差が見られなかった。

次に、N-ミristイル化モチーフをもたないTim9のN-末端にMic19のミristイル化モチーフを付加した場合に、そのミトコンドリアへのインポート速度がN-ミristイル化モチーフに依存して増加するかどうかを調べた(図43)。Tim9に比べてミristイル化モチーフを付加した融合タンパク質(Mic19WT(1-20)-Tim9)ではインポート速度の増大は見られず、むしろ減少した。変異型のミristイル化モチーフを付加した融合タンパク質(Mic19G2A(1-20)-Tim9)は、ミristイル化モチーフを付加した融合タンパク質(Mic19WT(1-20)-Tim9)とインポート速度はほぼ同じであった。以上のことから、N-ミristイル化モチーフは、すべての膜間部のタンパク質の輸送を増大させるわけではなく、Mic19特異的にインポート速度を増大させていることがわかった。

3.4.2 Tim9にMic19のDUFドメインを付加した融合タンパク質の*in vitro*タンパク質取り込み実験。

図43および図44の結果より、MIA40/TIM40経路の基質の輸送一般をN-ミristイル化モチーフが上昇させるわけではなく、Mic19特異的に輸送効率を増加させていることが示された。膜間部のMIA40/TIM40経路の他の基質タンパク質と比較すると、Mic19はDUFドメインと呼ばれるアミノ酸配列の長い領域を持つことがわかる(図44A)。そこで、Mic19のミristイル化モチーフおよびDUFドメインを付加したTim9のミトコンドリアへの取り込みを調べた(図44B)。Tim9にDUFドメインを付加した融合タンパク質(Mic19(21-127)-Tim9)では、ミトコンドリアへの結合も取り込みもほとんどみられなかった。

この Mic19 (21-127)-Tim9 にミリストイル化モチーフをさらに付加した融合タンパク質 (Mic19 WT(1-127)-Tim9) では、ミトコンドリアへの結合速度もインポート速度も Mic19 (21-127)-Tim9 に比べて大きく増大した。一方 N ミリストイル化モチーフの変異体である G2A を付加した Mic19 G2A(1-127)-Tim9 ではミトコンドリアへの結合速度もインポート速度も増えなかった。これらの結果をまとめると、Mic19 が DUF ドメインをもつことにより Mia40 のミトコンドリアへの輸送が阻害され、この輸送阻害の回復のために N-ミリストイル化モチーフが必要であることが考えられる。

3.4.3 Tim9 の N 端に構造を持たない配列を付加した融合タンパク質の *in vitro* タンパク質取り込み実験.

図 44 の結果から、DUF ドメインがある場合のみ N-ミリストイル化モチーフがミトコンドリア移行を促進することが示された。この現象が、DUF ドメインが構造をとるために引き起こるのか、配列特異的に起こるのか、あるいは単に DUF ドメインの長さが長いために起こるのかを検討することにした。DUF ドメインは高次構造予測をすると特定の高次構造をとらないことが報告されている [24]。そこで、Mic19 の DUF ドメインが構造をとるかを、PK 消化を行い他のドメインとの消化効率を比較することによって検討した (図 45)。Mic19WT-FLAG 株から単離したミトコンドリアを TX-100 で可溶化したのち特定の濃度で PK 消化を行ったところ、PK 濃度が低い場合には Mic19-FLAG 全長の分子量のバンド (22 kDa) が見られたが、PK 濃度を高濃度にしていくとバンドは見られなくなった。さらに、PK を 0.1 – 10 μ g/ml 加えた時に、CHCH ドメインと FLAG タグをあわせた分の分子量 (9.8 kDa) の位置にバンドが見られ、PK を 25 μ g/ml 以上加えた場合にこれらのバンドは見られなくなった。この結果は、Mic19 の DUF ドメインが構造をとらないため、CHCH ドメインに比べ PK 消化をうけやすいということを示唆するものである。次に、Mic19 の DUF ドメイン領域のアミノ酸配列特異的に N-ミリストイル化モチーフがミトコンドリア移行を促進するかを検討するため、大腸菌のタンパク質である PhoA の構造を持たない (アンフォールドした) 領域に置き換えた融合タンパク質を作成し、その *in vitro* タンパク質取り込み実験を行うことにした (図 46)。Mic19 の N-ミリストイル化モチーフを付加せず DUF ドメインを PhoA の構造をとらない 100 残基のドメインに置き換えた Mic19 Δ 20 PhoA(100) ではミトコンドリアへの結合や取り込みがほとんど見られないのに対し、N 末端にミリストイル化モチーフをもつ Mic19WT PhoA(100) ではミトコンドリアへの十分な結合と取り込みが見られた。また、N-ミリストイル化モチーフを変異させた Mic19G2A PhoA(100) では、ミトコンドリアへの結合も取り込みもほとんど見られなかった。この結果は、通常の Mic19 の N-ミリストイル化モチーフ変異体解析の結果 (図 37) と同様に、N-ミリストイル化モチーフ依存的にミトコンドリアへの取り込みが行われたことを示す。したがって、N-ミリストイル化モチーフがない場合に Mic19 のミトコンドリアへの輸送を阻害しているのは DUF ドメインの特定の配列ではなく、単にアンフォールドしたドメインの存在であることを示唆するものであることが考えられる。そしてこの輸送の阻害の回復には N-ミリストイル化モチーフのみが影響を与え、DUF ドメインやシステインモチーフは関与しないことになる。次に、この Mic19 の輸送の阻害がアンフォールドしたドメインの長さに依存することを確認するため、Mic19 の DUF ドメインを PhoA (100) に置き換えた融合タンパク質 Mic19 Δ 20 PhoA(100) の PhoA (100) の長さを短くしたときに、ミトコンドリアへの輸送の阻害が変化するかどうかを確かめることにした (図 47)。Mic19 Δ 20 phoA(100) ではほ

とんどミトコンドリアへと取り込まれなかったのに対して、PhoA 部分の長さを 60 残基に減らした Mic19 Δ 20 phoA(60)では Mic19WT と同等の量がミトコンドリアへと運ばれた。PhoA 部分の長さを 80 残基に減らした Mic19 Δ 20 phoA(80)では、Mic19 Δ 20 phoA(100)よりもミトコンドリア内へのインポート速度は増加したが、Mic19 Δ 20 phoA(60)よりもインポート速度は小さかった。したがって、CHCHドメインよりも N 側にあるアンフォールドしたドメインの長さが長くなるにつれてミトコンドリアへの取り込み効率が下がること、Mic19 の場合は 60 残基以上のアンフォールドしたドメインがあると、ミトコンドリアへの輸送の阻害が起こることがわかった。これらのことから、N-ミリストイル化モチーフがミトコンドリア移行を促進する条件は、Mia40 と相互作用する領域の前に少なくとも 80 残基以上の構造を持たないドメインが存在することであることがわかった。

3.5 Mic19 と Sam50 の相互作用とその意義について

哺乳動物では、ミトコンドリア内で Mic19 と Sam50 は相互作用することが報告されており、また Sam50 自身がクリステ膜の形成に関与する可能性が示唆されている。そこで、Mic19 と Sam50 が相互作用をしない変異体である Mic19 G2A の変異体がミトコンドリアの外側にあるのか内部(膜間部)にあるのか、または SAM 複合体に影響を与えるのかを確かめることにした。

3.5.1 局在化解析

Mic19 の変異体が、膜間部での局在に影響を与えるかどうかを調べるため、Mic19 Δ /Mic19(WT or G2A or C146S/C157S)-FLAG 株から単離したミトコンドリアを超音波処理し、その後ショ糖密度勾配遠心を行うことで、外膜と内膜を分画をした(図 48,49,50)。密度勾配遠心後のサンプルでは、外膜タンパク質の Tom40 が密度が小さい上のフラクションに、内膜タンパク質の Tim23 が密度が大きい下のフラクションに回収された。また MICOS 複合体構成因子で内膜に局在する Mic60 は Tim23 と同様に、下のフラクションに回収されることを確認した。Mic19 を認識する FLAG 抗体で検出を行ったところ、Mic19(WT)-FLAG および Mic19(C146S/C157S)-FLAG においては、Mic19-FLAG が外膜を含むフラクション全体に回収されたが、ミリストイル化モチーフの変異体である Mic19(G2A)-FLAG においては、内膜タンパク質である Tim23 や Mic60 と全く同じ挙動を示し外膜画分には回収されなかった。このことから、出芽酵母ミトコンドリア内においては、Mic19 の N-ミリストイル化モチーフは Mic19 の外膜への局在を可能にすると考えられる。

3.5.2 複合体解析

上述の各 Mic19-FLAG を発現する株から単離したミトコンドリアを 1%ジギトニンで可溶化し、BNE で展開して、ウェスタンブロッティングによる検出を行った(図 51)。Mic60 と Mic19(FLAG) では MICOS 複合体に期待される高分子量側にバンドがみられることを確認した。このバンドは以前に MICOS I と MICOS II と報告された分子量(それぞれ 1000 kDa, 850 kDa)と一致した。さらに Mic19WT では Sam50 が MICOS I とみられる位置にバンドを生じたが(赤矢印)、Mic19(WT)-FLAG および Mic19(C146S/C157S)-FLAG を含むミトコンドリアでは、Sam50 は MICOS I の位置にバンドを生じなかつ

た.

次に、この Sam50 抗体で見られたバンドが Mic19 を含むかどうかを確かめることにした. 各 Mic19-FLAG を発現する株から単離したミトコンドリアを 1%ジギトニンで可溶化した後、抗 FLAG-agarose により共免疫沈降実験を行った. このサンプルを用い二次元電気泳動(1次元目は BNE, 2次元目は SDS-PAGE)で展開後、ウェスタンブロッティングで検出を行った(図 52). FLAG 抗体により Mic19WT-FLAG を検出すると 480 kDa~1200 kDa に濃いシグナルが広がっており、66 kDa~480 kDa の間には薄くシグナルが広がっていた(図 52 A). これに対して Mic19G2A-FLAG では 480 kDa~1200 kDa のシグナルは薄くなっており、66 kDa~480 kDa には濃いシグナルがみられた(図 52B). このことは N-ミリストイル化モチーフの存在が Mic19 の MICOS 複合体への組み込みを促進することを示唆する. さらに、Mic19C146S/C157S-FLAG では 66 kDa~126kDa にしかシグナルが見られなかった(図 52C). また、Mic12 抗体で検出すると、Mic19WT-FLAG や Mic19G2A-FLAG では 66 kDa から 1200 kDa で全体的に広がるシグナルが見られたのに対して(図 52 A, B), Mic19C146S/C157S-FLAG ではシグナルが見られなかった(図 52 C). このことは Mic19 のシステインモチーフが分子内ジスルフィド結合を作ることが約 1000 kDa の分子量の MICOS 複合体の形成に必要であるという以前の報告に合致する. Sam50 抗体で検出すると、Mic19WT-FLAG では 480 kDa~1200 kDa の間に見られるシグナルと、146 kDa~242 kD の間に濃いシグナルが見られた(図 52 A). また、Mic19G2A-FLAG ではどちらの大きさのシグナルも見られず(図 52 C), Mic19G2A-FLAG では 480 kDa~1200 kDa の間にシグナルは見られなかった(図 52 B). 146 kDa~242 kDa に見られるシグナルは通常の SAM 複合体の大きさと一致することから Mic19 は、ミリストイル化モチーフにより SAM 複合体と相互作用することが示された. また、480 kDa~1200 kDa に見られる薄いシグナルは Mic19WT-FLAG でしか見られなかったことから、SAM 複合体が MICOS 複合体と相互作用するためには、Mic19 の N-ミリストイル化モチーフとシステインモチーフの両方が必要であることが示された.

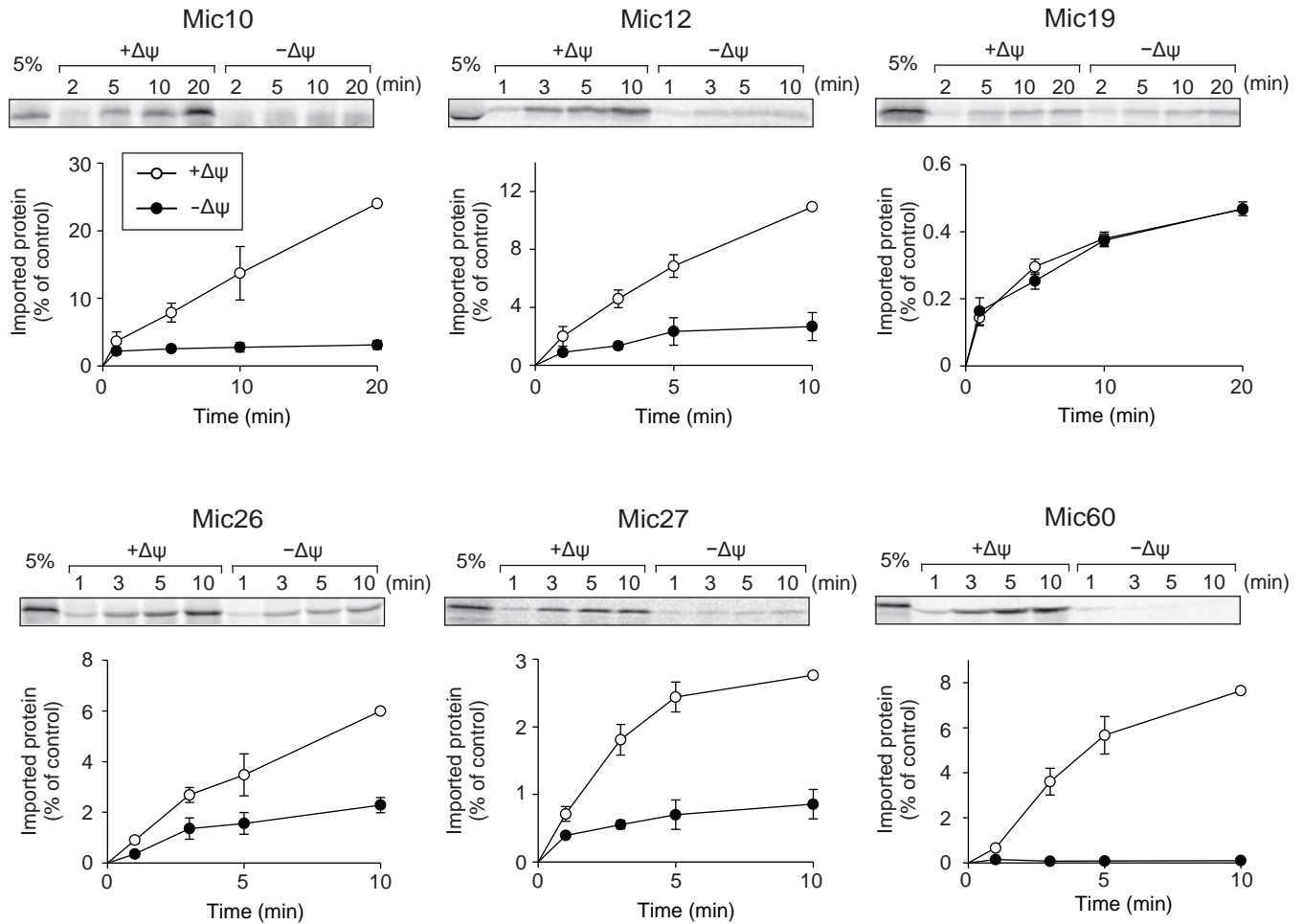


図 . 6 膜電位の有無での輸送量の変化。

RI ラベルした各タンパク質を単離ミトコンドリアとともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。この際、ミトコンドリアに何も加えなかったサンプルとバリノマイシンを加え膜電位を失わせたサンプルを用いた。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開しラジオイメージングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5 % を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は +Δψ、黒丸 (●) は -Δψを表す。

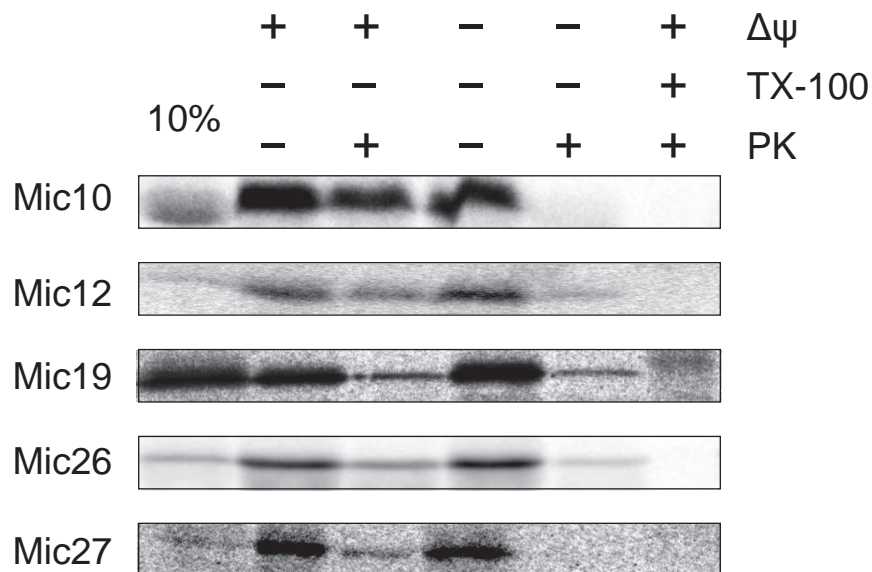


図 7 PK 耐性の確認.

RI ラベルした各タンパク質を, 単離ミトコンドリアとともに 25℃で 30 分間インキュベートをして取り込み反応を行った. この取り込み実験の際, ミトコンドリアに何も加えなかったサンプルとバリノマイシンを加え膜電位を失わせたサンプルを用いた. TX-100 (+) は取り込み反応後, 膜を可溶化したものをあらわし, PK (+) は PK 消化を行ったものをあらわす. 10 % は取り込み反応に使用した基質の 10 % を表す. これらの処理を行ったサンプルを SDS-PAGE で展開しラジオイメージングにより解析した.

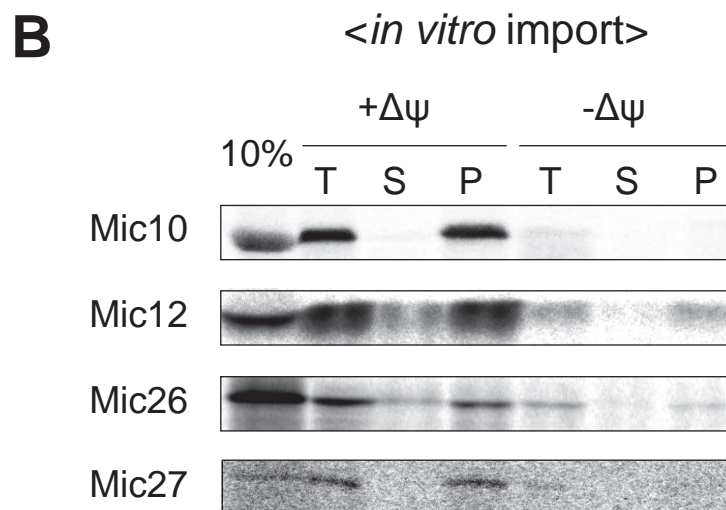
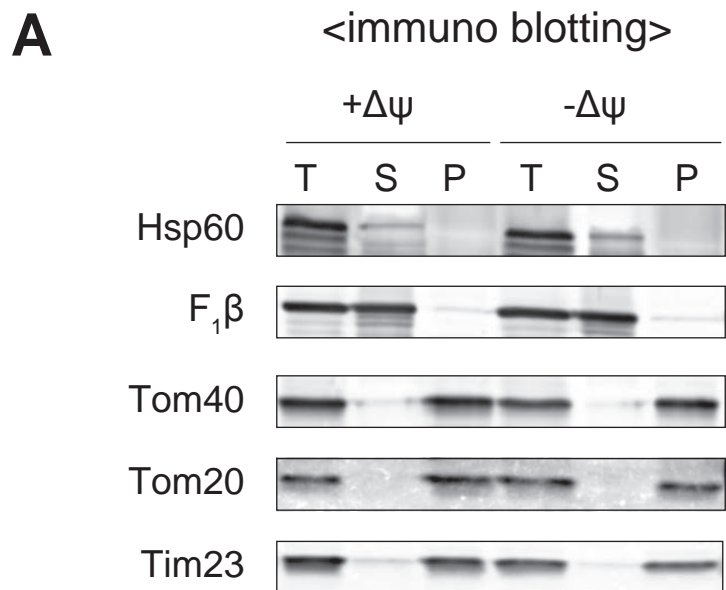


図 8 膜挿入の確認.

A. 単離ミトコンドリアを 25℃で 30 分間インキュベートした後、プロテアーゼ消化を行った (T). 遠心で回収したミトコンドリアを 200 mM Na₂CO₃ 溶液で処理したのち、超遠心により上清 (S) と沈殿 (P) に分けた. このサンプルを Western blotting を行いもともと細胞内にあるタンパク質を検出することでアルカリ抽出が適正であるかの評価を行った.

B. RI ラベルした各タンパク質を, 単離ミトコンドリアとともに 25℃で 30 分間インキュベートをして取り込み反応を行った. この取り込み実験の際, ミトコンドリアに何も加えなかったサンプルとバリノマイシンを加え膜電位を失わせたサンプルを用いた. in vitro タンパク質取り込み実験後に A と同様の操作を行いアルカリ抽出を行った. アルカリ抽出後のサンプルは SDS-PAGE で展開しラジオイメーキングにより解析を行った. なお, 10 % は取り込み反応に使用した基質の 10 % を表す.

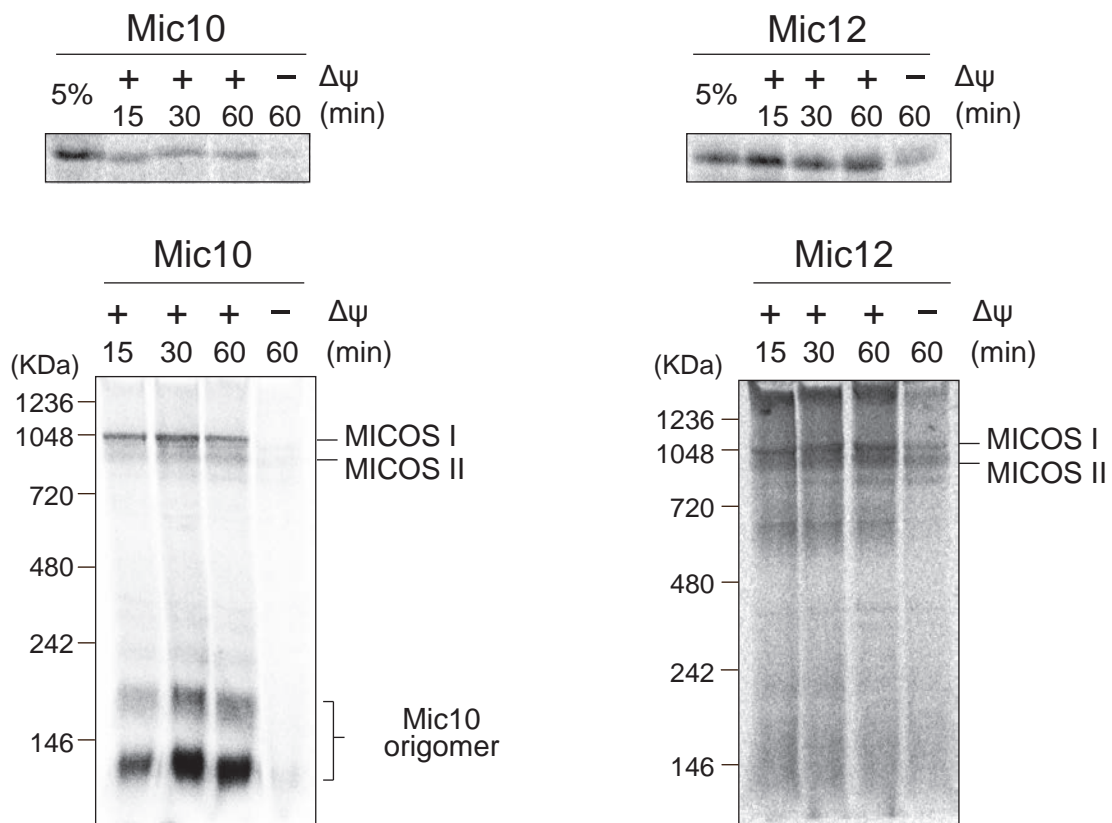


図 9 複合体形成の確認.

RI ラベルした各タンパク質を単離ミトコンドリアとともに 25℃で、一定時間インキュベートした後、SDS-PAGE（上パネル）と BNE（下パネル）で展開し解析を行った。5% は取り込み反応に使用した基質の 5% を表す。

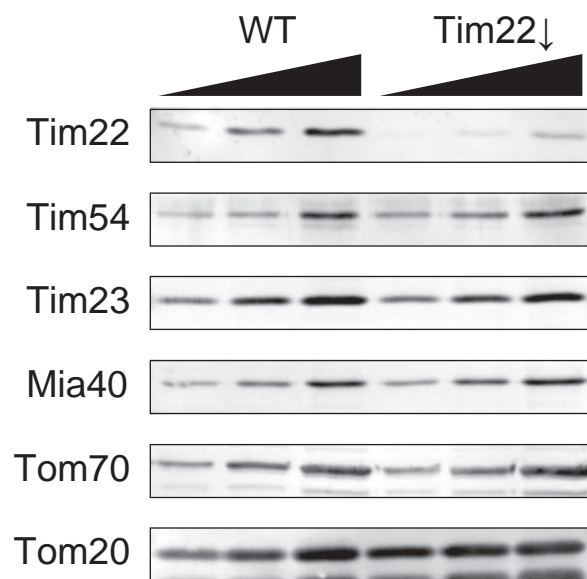


図 10 W303-1A (WT) および GAL-TIM22 単離ミトコンドリアのタンパク質量の確認.

W303-1A (WT) 株 および GAL-TIM22 (Tim22↓) 株を, GAL プロモーターの下流にある遺伝子の発現を抑制する 0.05% グルコースを含むラクテート培地で 16 時間, 23℃で培養した後, ミトコンドリアを単離した. 単離ミトコンドリアを SDS-PAGE で展開し、Western blotting を行うことで, 各膜透過装置のタンパク量を検出した.

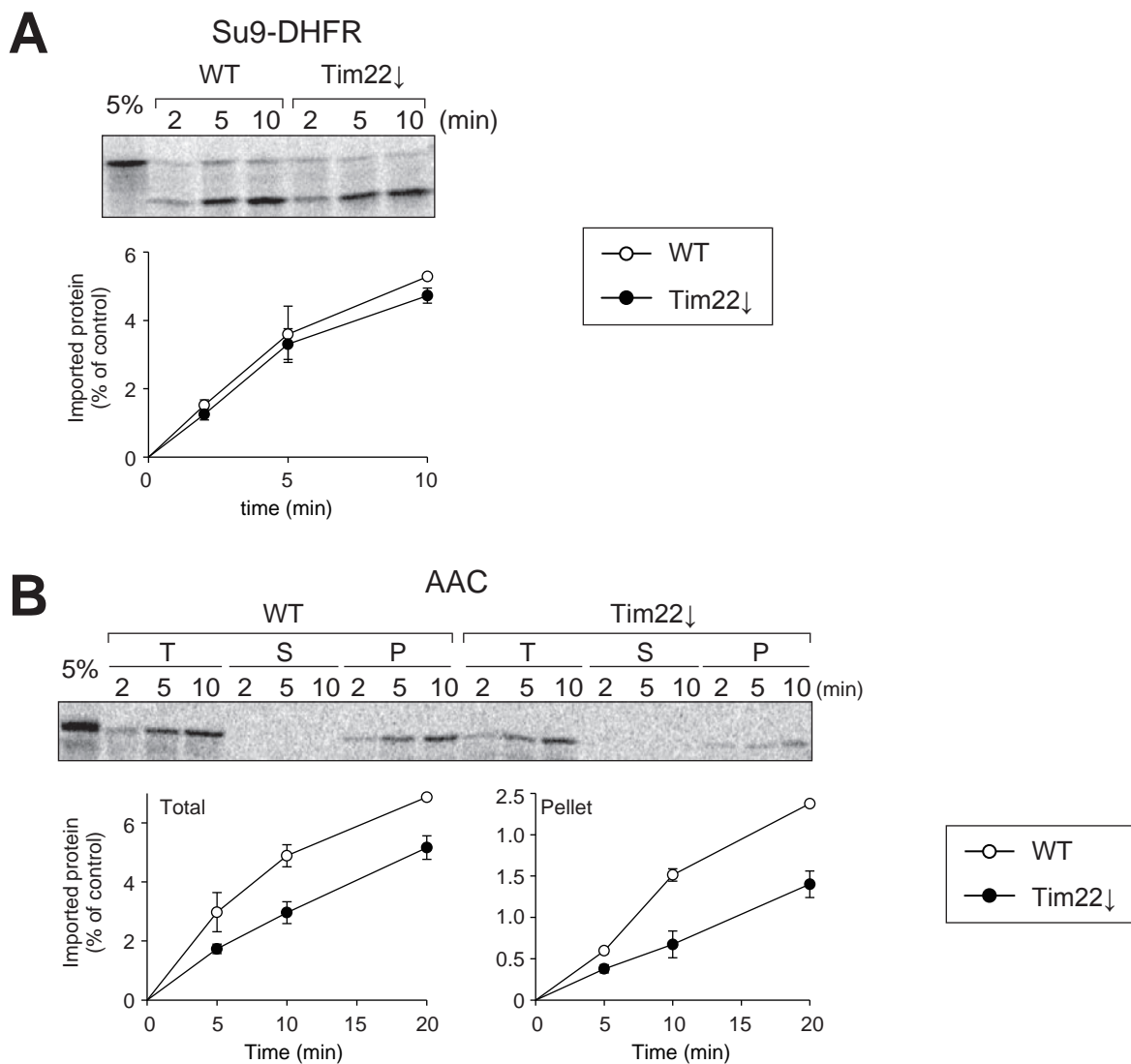


図 11 TIM22 経路を阻害した際の in vitro タンパク質取り込み実験のコントロール実験.

(図 10) でタンパク量を確認した単離ミトコンドリアをプレーンキュベートしたのち、RI ラベルしたコントロールタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメーキングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は Tim22↓ミトコンドリアを使った場合を表す。

A. 輸送が TIM22 複合体に依存しないと知られている Su9-DHFR を基質として用いた (ネガティブコントロール)。B. 輸送が TIM22 複合体に依存する AAC を基質として用いた (ポジティブコントロール)。またこのとき、ミトコンドリア内へと取り込まれることが内膜へと挿入されることと同様であるかをアルカリ抽出により確かめた。(T) は通常 PK 消化後のサンプルをあらわし、アルカリ抽出後の沈殿は (P)、上清は (S) とあらわしている。

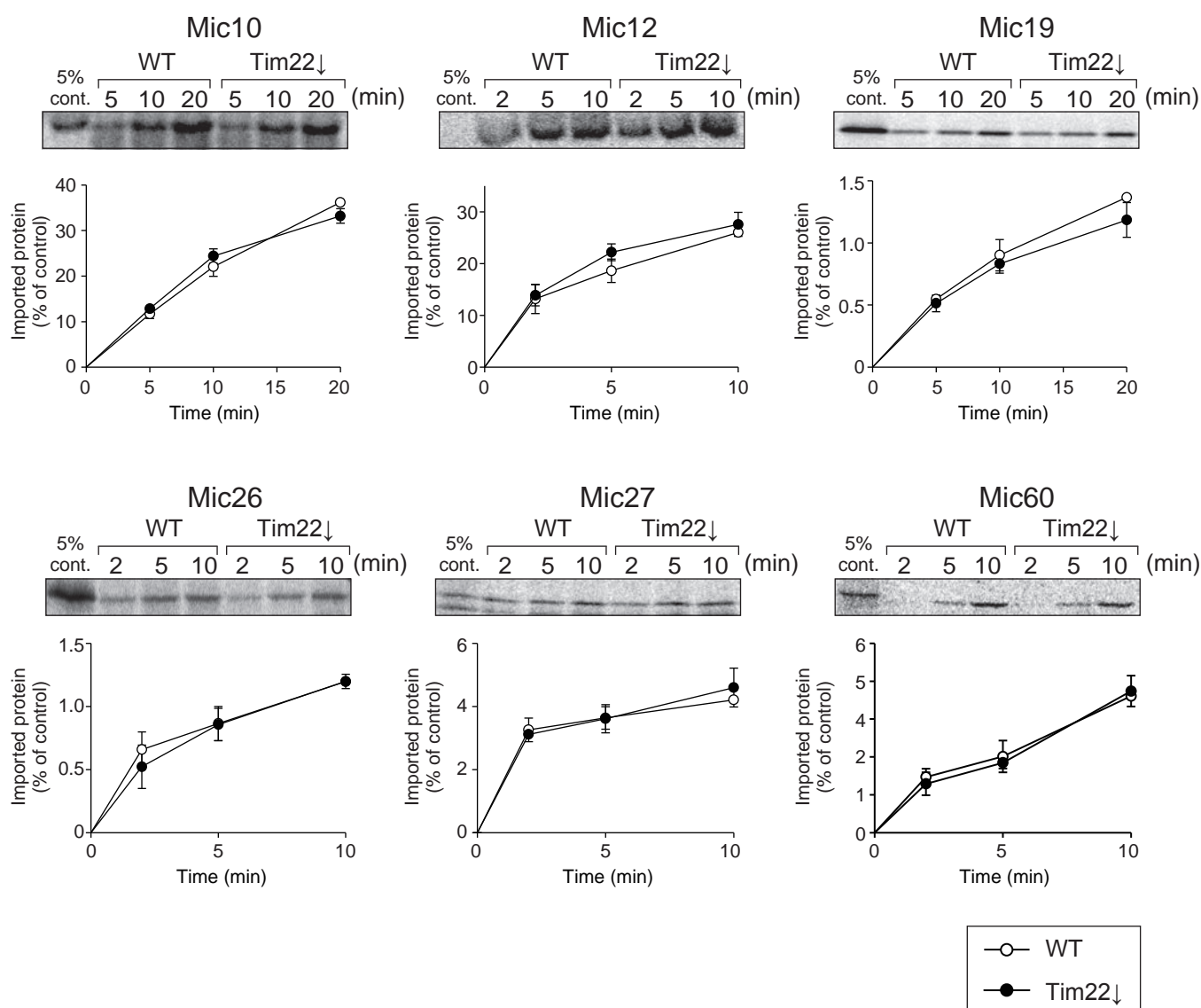


図 12 TIM22 経路を阻害した際の MICOS 複合体構成因子の in vitro タンパク質取り込み実験

(図 10,11) で使用した単離ミトコンドリアをプレーンキュベートしたのち、RI ラベルしたタンパク質とともに 25℃ で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5 % を表し、取り込みに用いた基質を 100 % とし、グラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は Tim22↓ ミトコンドリアを使った場合を表す。

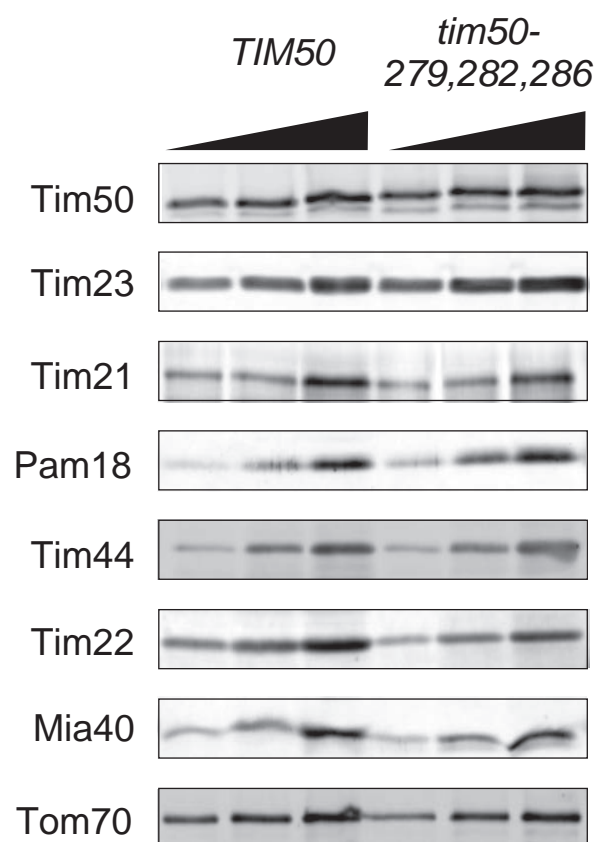


図 13 *TIM50* および *tim50-279,282,286* 単離ミトコンドリアのタンパク質量の確認.
Tim50 野生型 (*TIM50*) 株 および変異体 (*tim50-279,282,286*) 株を, 0.05% グルコースを含むラクテート培地を用いて 23℃で培養した, 培養した株からミトコンドリアを単離したのち, これらの単離ミトコンドリアを SDS-PAGE で展開し、Western blotting を行うことで, 各膜透過装置のタンパク量を検出した.

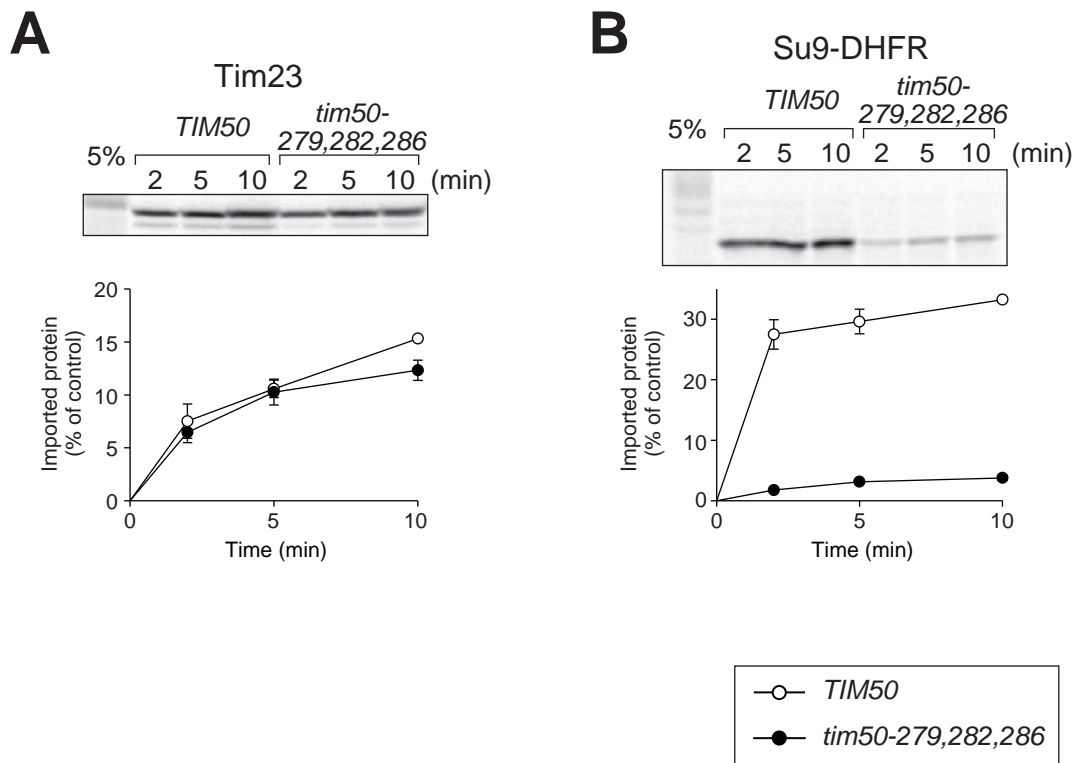


図 14 TIM23 経路を阻害した際の in vitro タンパク質取り込み実験のコントロール実験.

(図 13) でタンパク量を確認した単離ミトコンドリアをブレインキュベートしたのち、RI ラベルしたコントロールタンパク質とともに 25℃ で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメーキングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5 % を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は TIM50 ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *tim50-279,282,286* ミトコンドリアを使った場合を表す。

A. 輸送が TIM23 複合体に依存しないと知られている Tim23 を基質として用いた (ネガティブコントロール)。B. 輸送が TIM23 複合体に依存する Su9-DHFR を基質として用いた (ポジティブコントロール)。

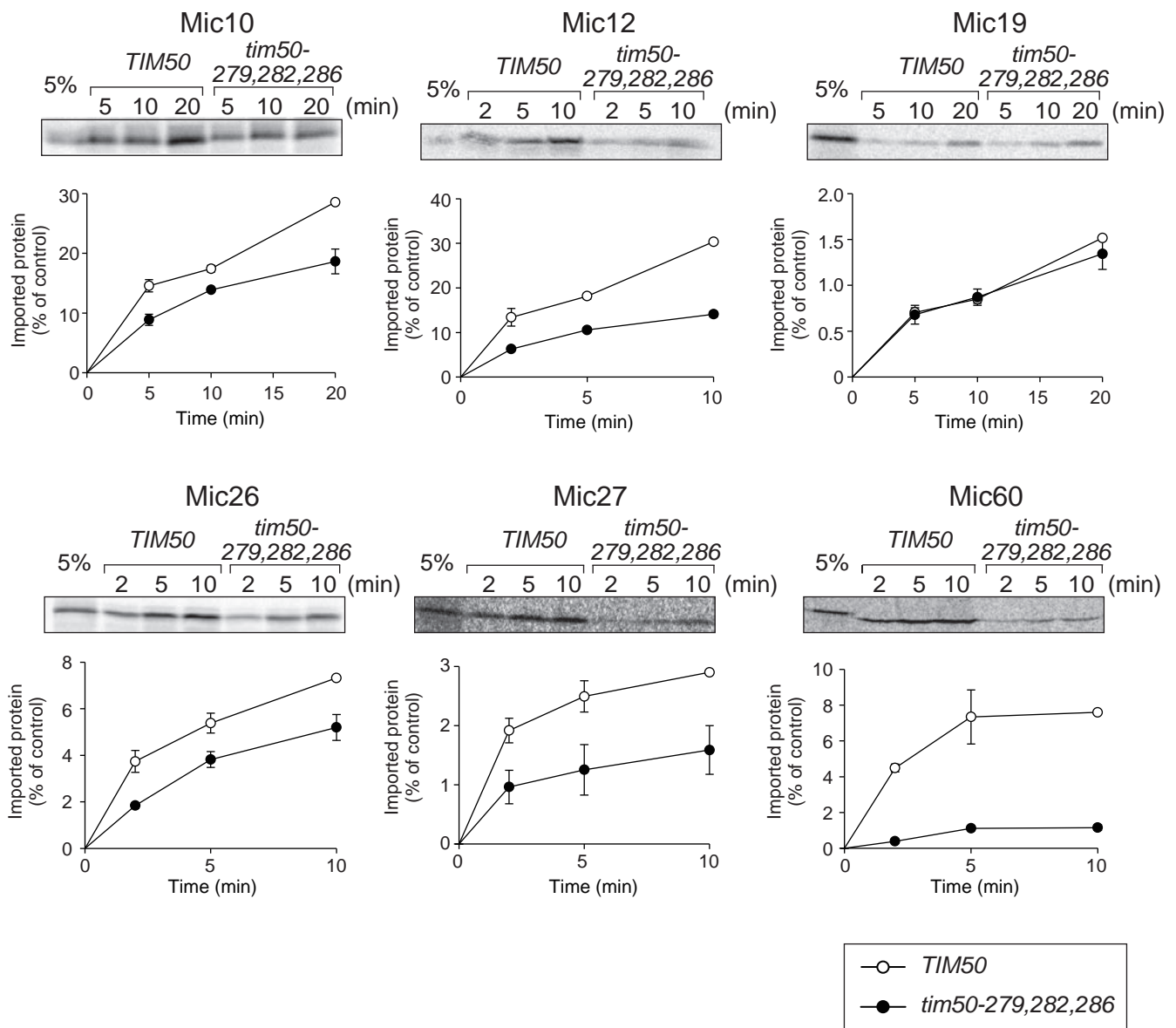


図 15 TIM23 経路を阻害した際の MICOS 複合体構成因子の in vitro タンパク質取り込み実験

(図 13,14) で使用した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は TIM50 ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は tim50-279,282,286 ミトコンドリアを使った場合を表す。

A

40 50 60 70
 DTKWDIVLSN **MLVKTAMGFG VGVFTSVLFF** **KRR**AFPVWLG
 Transmembrane 1

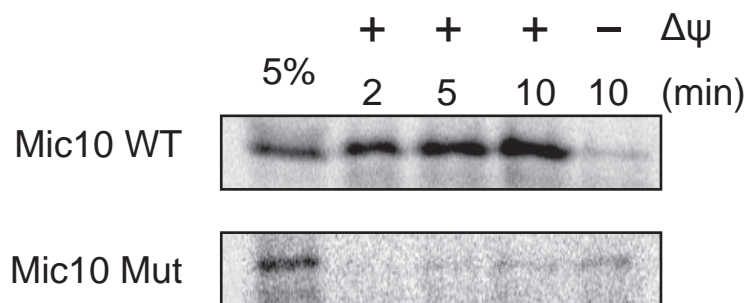
B

図 16 Mic10 の 1 つ目の膜貫通領域の直後にあり正電荷をもつアミノ酸は輸送シグナルとして働く。

A. Mic10 の 1 つ目の膜貫通領域付近のアミノ酸配列. B. 単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたタンパク質を 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った. インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した.

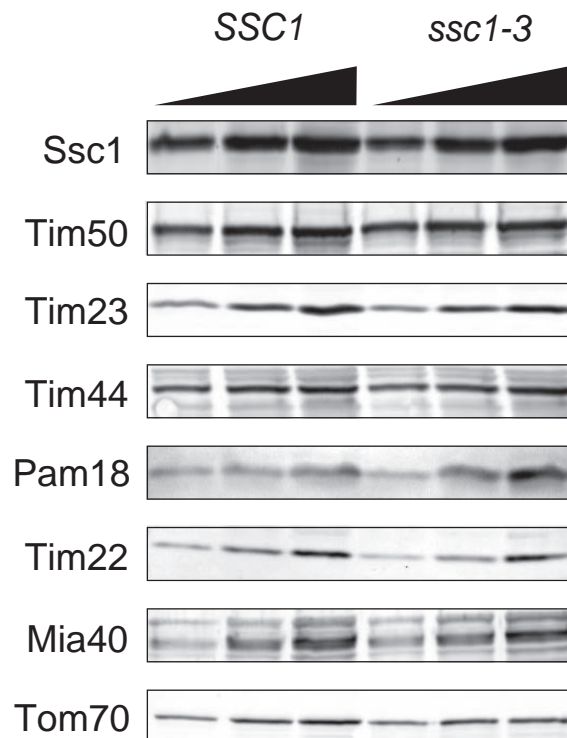


図 17 *SSC1* および *ssc1-3* 単離ミトコンドリアのタンパク質量の確認.

Ssc1 野生型 (*SSC1*) 株 および変異体 (*ssc1-3*) 株を, 0.05% グルコースを含むラクテート培地を用いて 23℃で培養した, 培養した株からミトコンドリアを単離したのち, これらの単離ミトコンドリアを SDS-PAGE で展開し、Western blotting を行うことで, 各膜透過装置のタンパク量を検出した.

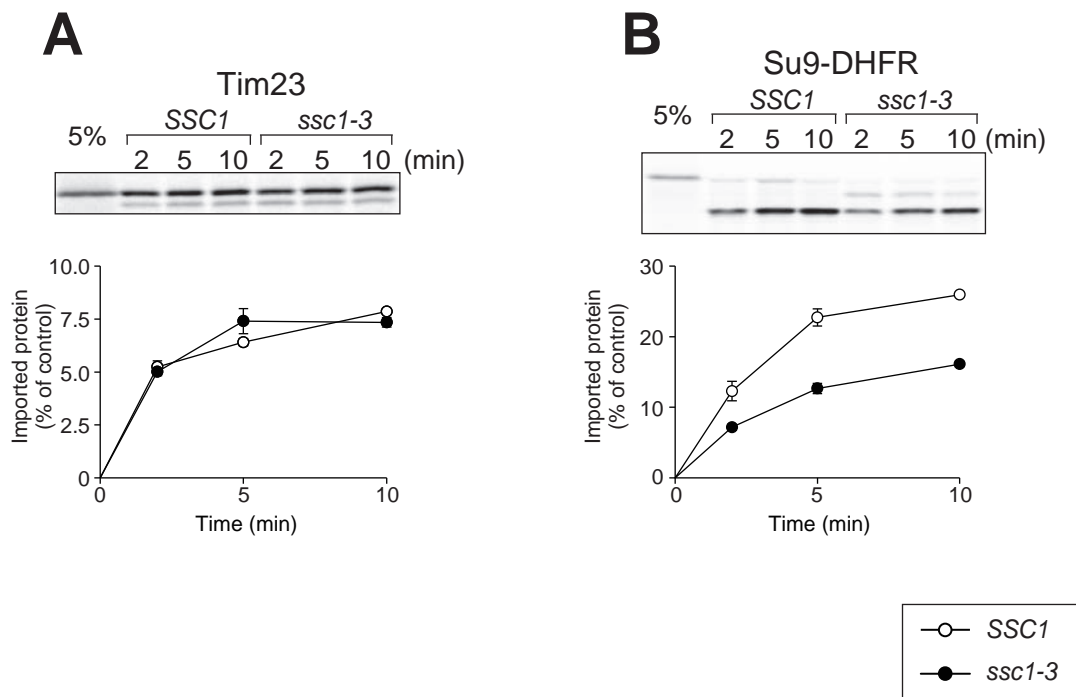


図 18 *ssc1-3* ミトコンドリアを用いた *in vitro* タンパク質取り込み実験のコントロール実験.

(図 17) でタンパク量を確認した単離ミトコンドリアを 37℃ で 2 分間プレインキュベートしたのち、RI ラベルしたコントロールタンパク質とともに 30℃ で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメーキングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5 % を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は *SSC1* ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *ssc1-3* ミトコンドリアを使った場合を表す。

A. 輸送が *Ssc1* に依存しないと知られている *Tim23* を基質として用いた (ネガティブコントロール)。B. 輸送が *Ssc1* に依存する *Su9-DHFR* を基質として用いた (ポジティブコントロール)。

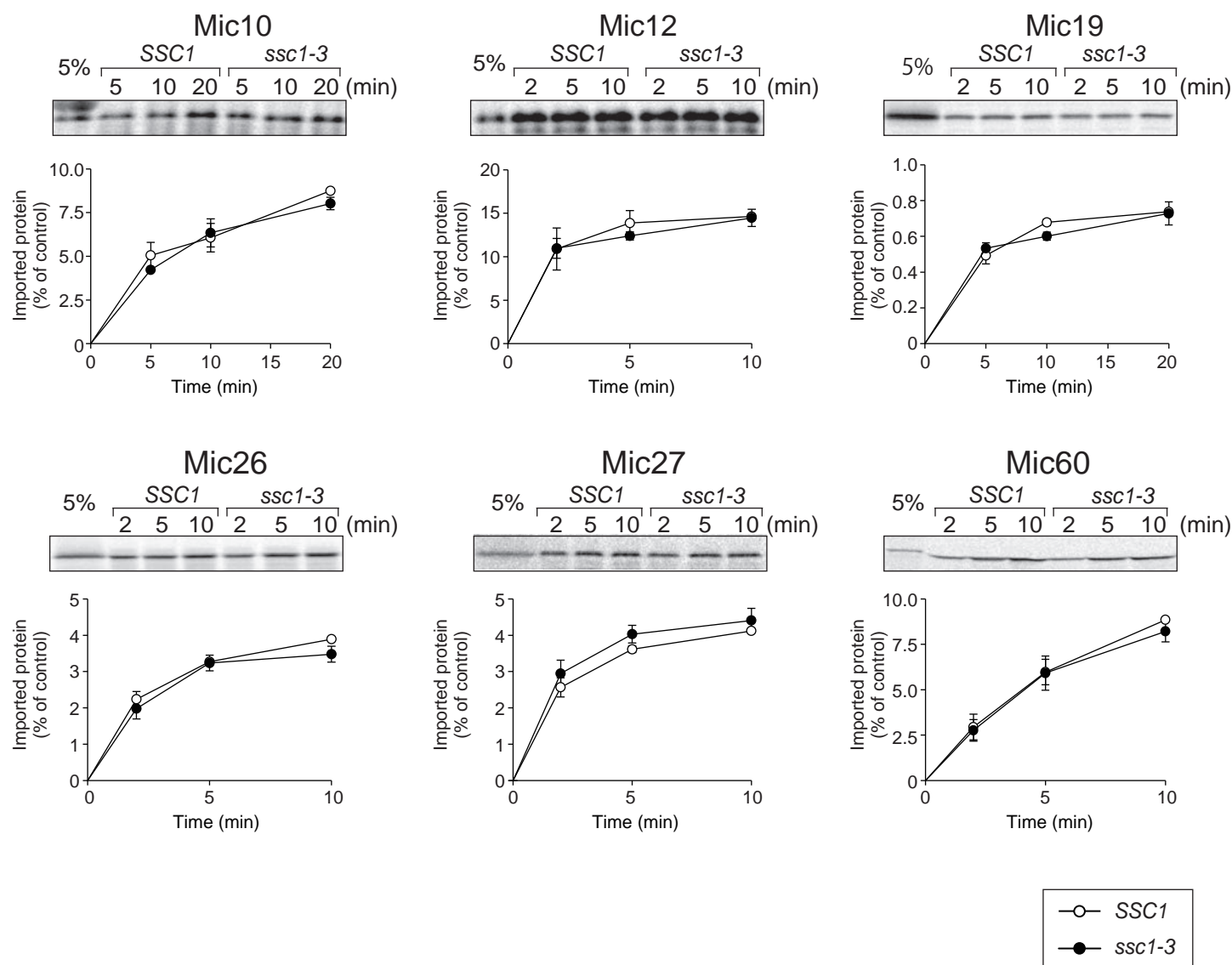


図 19 *ssc1-3* ミトコンドリアでの MICOS 複合体構成因子の in vitro タンパク質取り込み実験

(図 17,18) で使用した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたタンパク質とともに 25℃ で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した。5% は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100% としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は SSC1 ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *ssc1-3* ミトコンドリアを使った場合を表す。

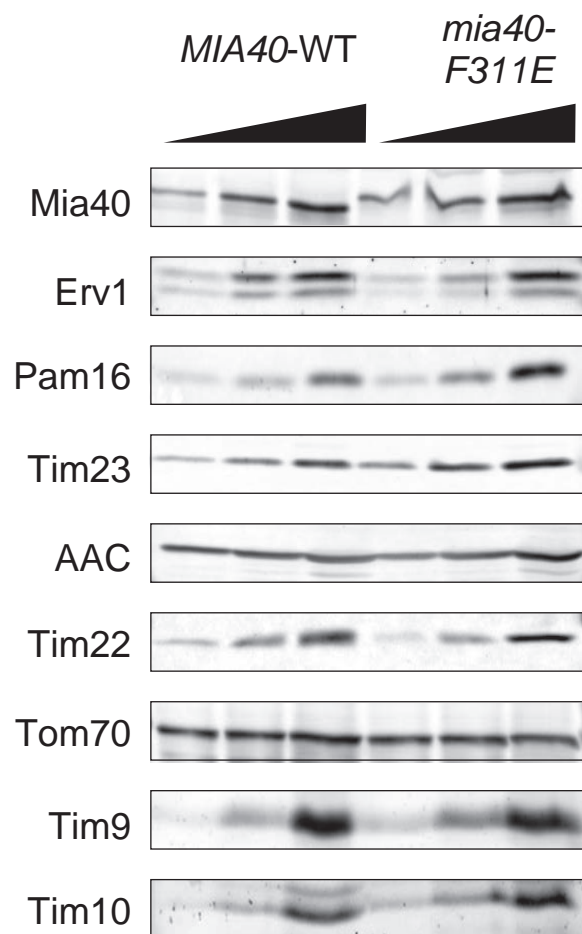


図 20 *MIA40-WT* および *mia40-F311E* 単離ミトコンドリアのタンパク質量の確認.
 Mia40 野生型 (*MIA40-WT*) 株 および変異体 (*mia40-F311E*) 株を, 0.05% グルコースを含むラクテート培地を用いて 23℃で培養した, 培養した株からミトコンドリアを単離したのち, これらの単離ミトコンドリアを SDS-PAGE で展開し、Western blotting を行うことで, 各膜透過装置のタンパク量を検出した.

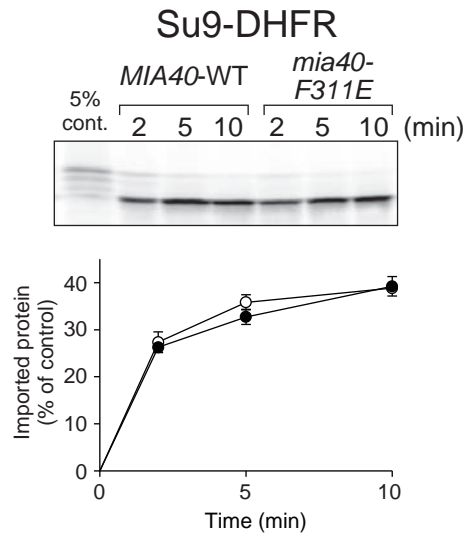
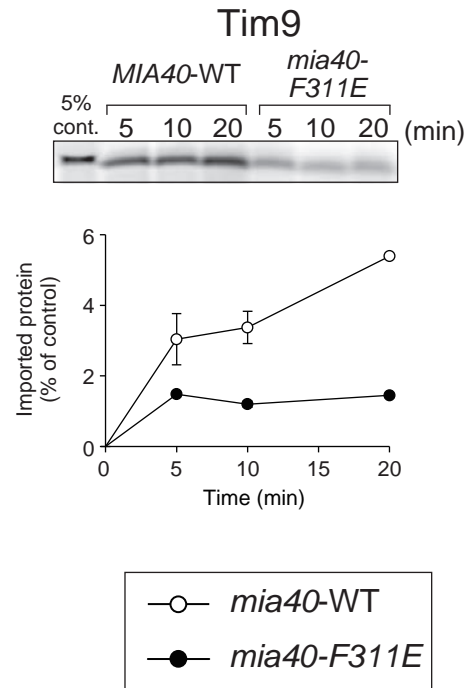
A**B**

図 21 *mia40-F311E* ミトコンドリアでの in vitro タンパク質取り込み実験のコントロール.

(図 20) でタンパク量を確認した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたコントロールタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメーキングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は MIA40-WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *mia40-F311E* ミトコンドリアを使った場合を表す。

A. 輸送が Mia40 に依存しないと知られている Su9-DHFR を基質として用いた (ネガティブコントロール). B. 輸送が Mia40 に依存する Tim9 を基質として用いた (ポジティブコントロール).

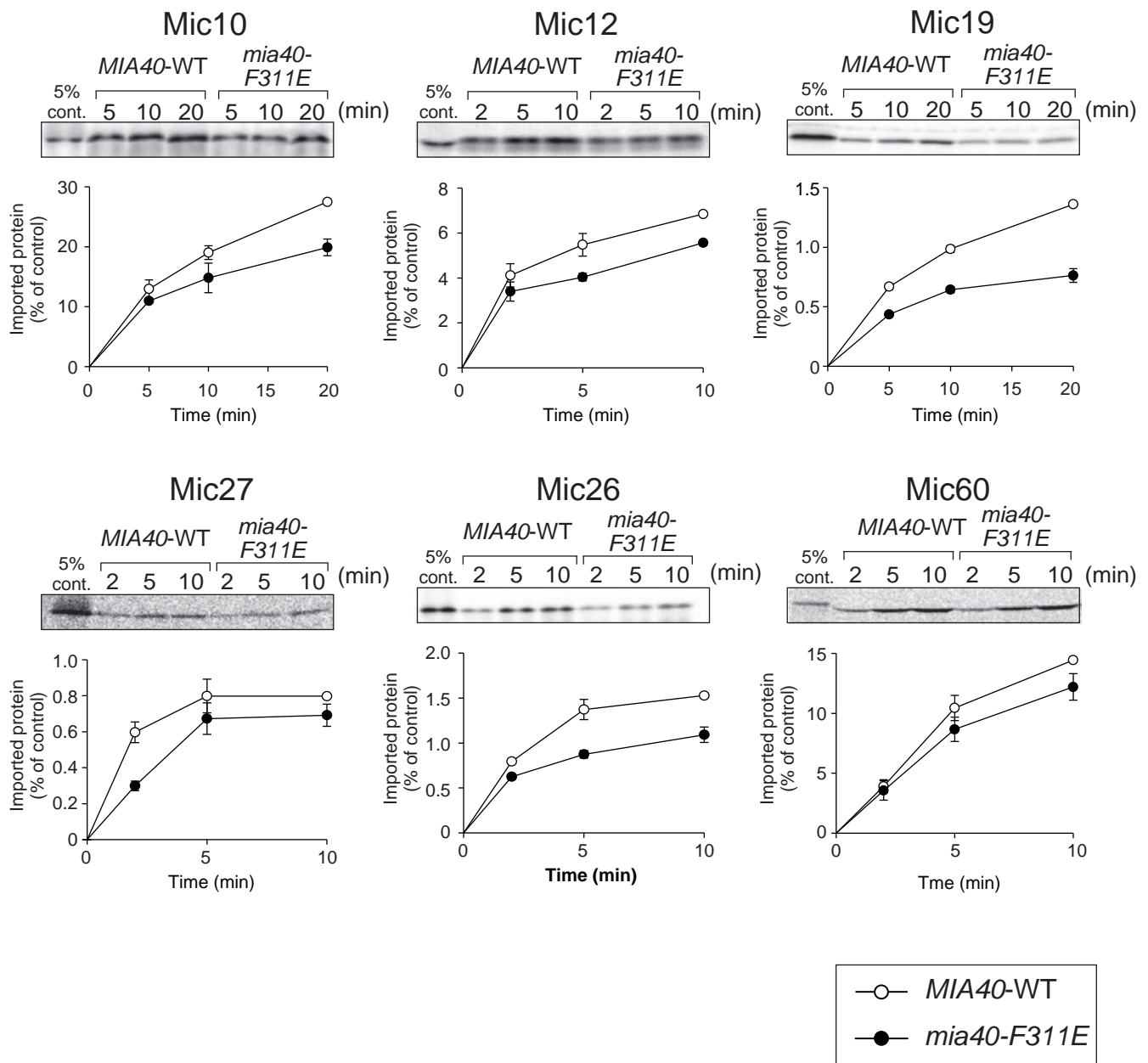


図 22 *mia40-F311E* ミトコンドリアでの MICOS 複合体構成因子の in vitro タンパク質取り込み実験。

(図 20,21) で使用した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5 % を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は MIA40-WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *mia40-F311E* ミトコンドリアを使った場合を表す。

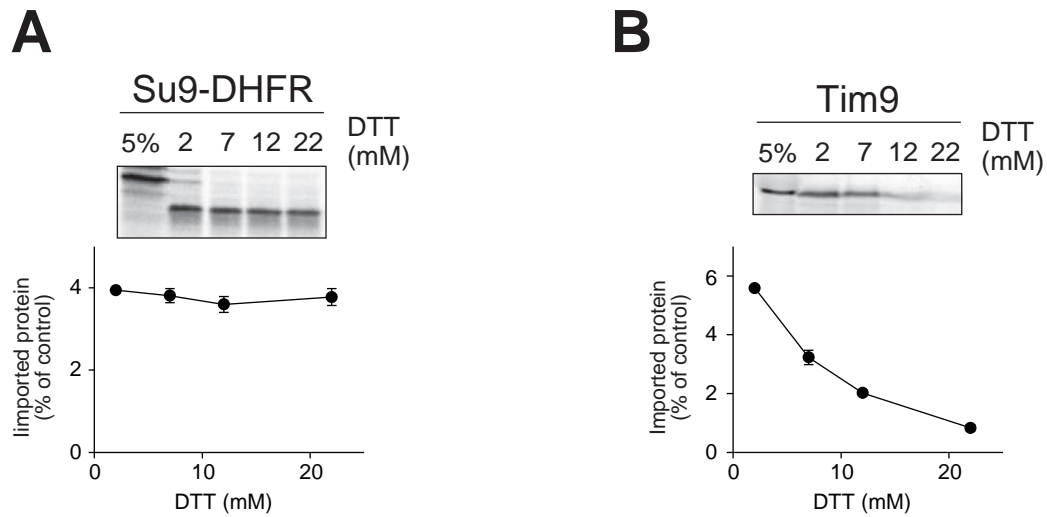


図 23 DTT 濃度依存性のコントロール実験.

D273-10B 株から単離したミトコンドリアと RI ラベルしたタンパク質を, 各 DTT 濃度存在下でインキュベートし, ミトコンドリアへと取り込ませた. PK 消化によりミトコンドリアへと取り込まれなかったタンパク質を消化後, SDS-PAGE で展開, ラジオイメージングにより解析を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. エラーバーは標準誤差 (n=3) を表す.

A. 輸送が Mia40 に依存せず, DTT 濃度に影響を受けない Su9-DHFR を用いて, 取り込み実験を行ったもの. B. 輸送が Mia40 に依存し, DTT 濃度に影響を受ける Tim9 を用いて, 取り込み実験を行ったもの.

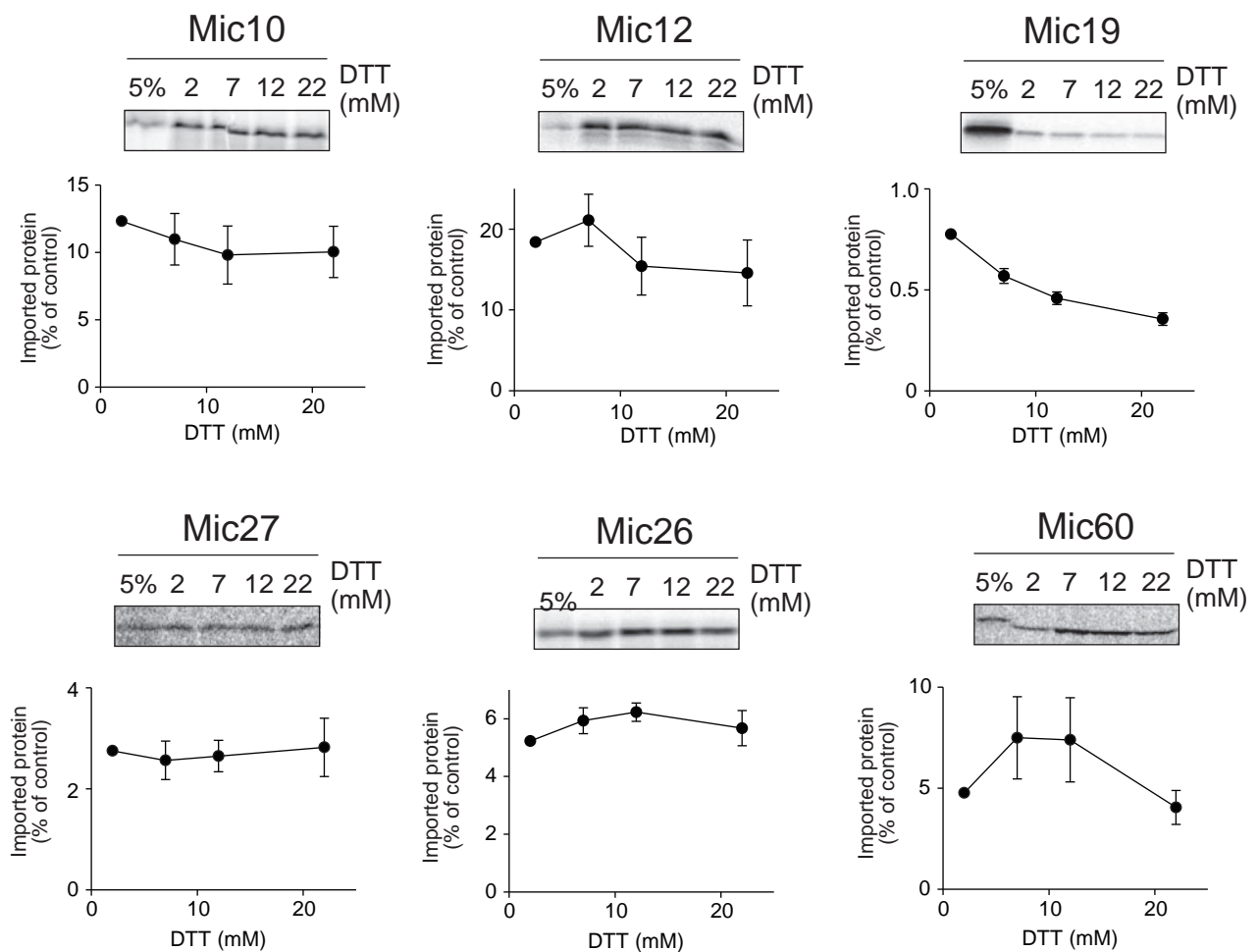


図 24 MICOS 複合体を用いた, DTT 濃度依存性実験.

D273-10B 株から単離したミトコンドリアと RI ラベルしたタンパク質を, 各 DTT 濃度存在下でインキュベートし, ミトコンドリアへと取り込ませた. PK 消化によりミトコンドリアへと取り込まれなかったタンパク質を消化後, SDS-PAGE で展開, ラジオイメージングにより解析を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5 % を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. エラーバーは標準誤差 (n=3) を表す.

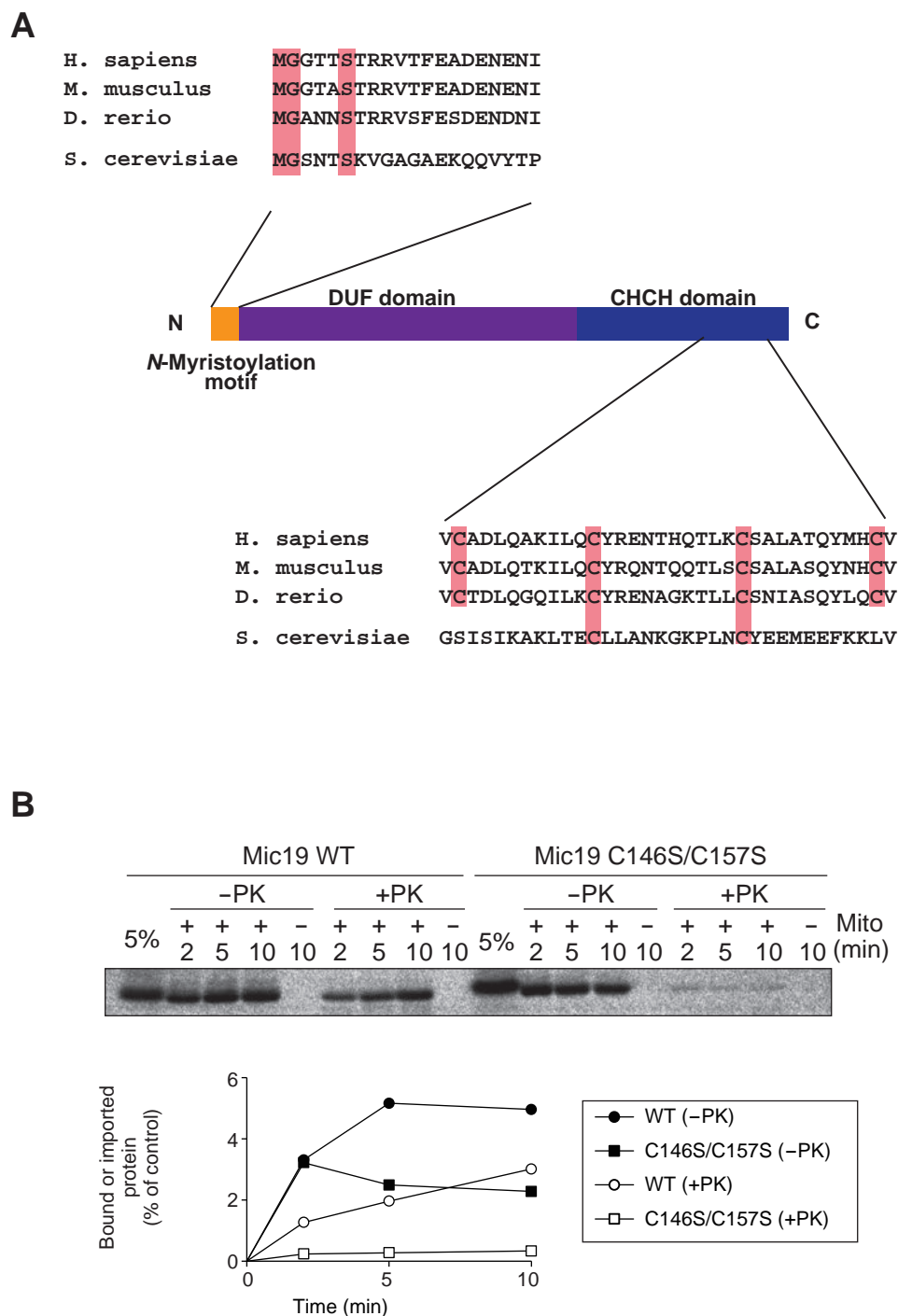


図 25 Mic9 とそのシステイン変異体の in vitro タンパク質取り込み実験.

A. 出芽酵母の Mic9 と他の生物種の Mic9 の配列比較.

B. RI ラベルした Mic9 の野生型 (WT) あるいはそのシステイン変異体である C146S/C157S を, 単離ミトコンドリアを混合し, 25℃で一定時間インキュベートすることでミトコンドリアへと取り込ませた. +PK のサンプルではこののち PK 消化を行った. PK 消化を行わなかったサンプル (-PK) および PK 消化を行ったサンプルの両方とも, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメージングにより検出を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した.

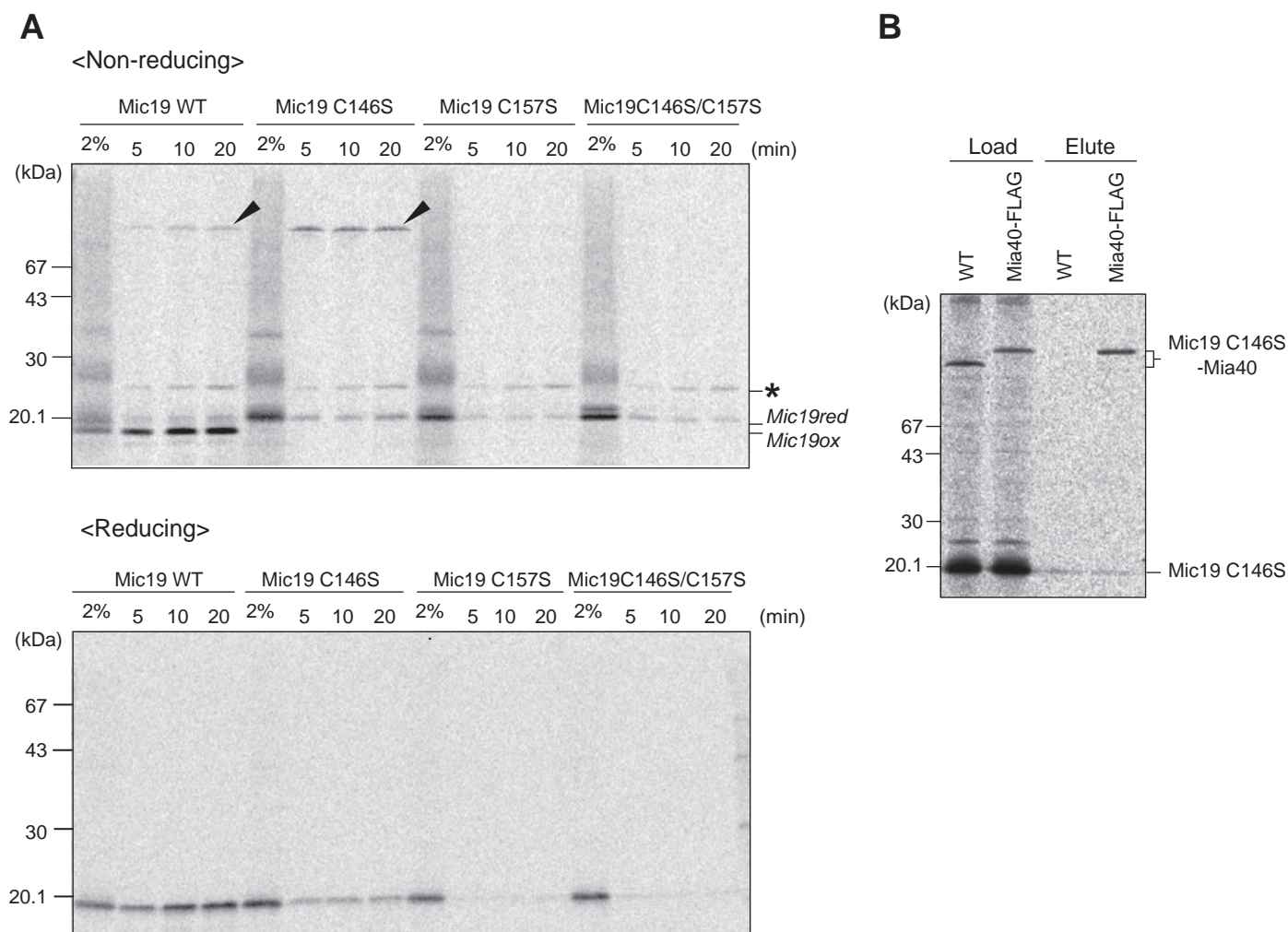


図 26 Mic19 とそのシステイン変異体の in vitro タンパク質取り込み実験.

A. RI ラベルした Mic19 の野生型 (WT) あるいはそのシステイン変異体 (C146S, C157S, C146S/C157S) を, 単離ミトコンドリアと混合し, 25°C で一定時間インキュベートすることでミトコンドリアへと取り込ませたこのサンプルに PK を加え, 取り込まれなかったタンパク質の消化を行った. こののちβメルカプトエタノールを加えなかったサンプル (Non-reducing) と加えたサンプル (Reducing) にわけ, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメージングにより検出を行った.

B. RI ラベルした Mic19 の C146S を, 野生型 (WT) あるいは Mia40-FLAG 株から単離したミトコンドリアと 25°C で 30 分インキュベートをし, FLAG による共免疫沈降実験を行った. Load は共免疫沈降実験前のサンプルをあらわし, Load は共免疫沈降実験後をあらわす.

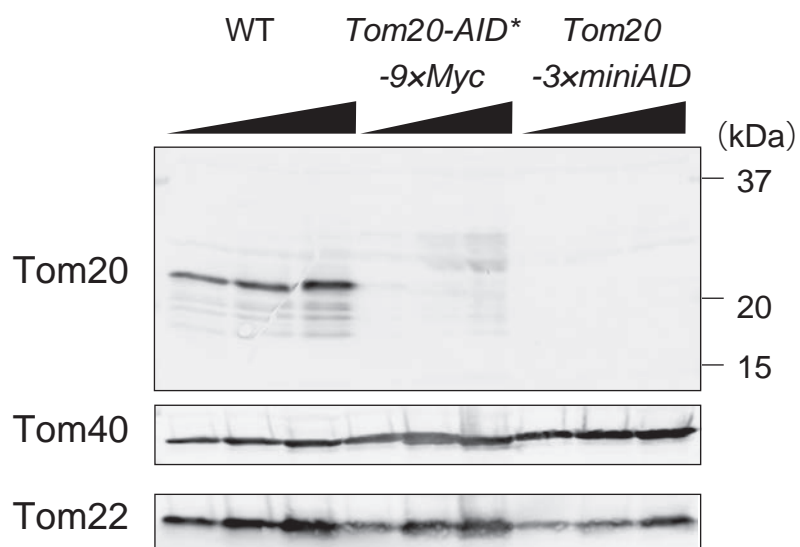


図 27 W303-1A (WT) および Tom20-AID タグ付加株から単離したミトコンドリアのタンパク質量の確認.

W303-1A (WT) 株 および Tom20 に AID タグを付加した株 (*Tom20-AID**-9xMyc, *Tom20-3 xmini-AID*) を, ラクテート培地で培養した後, ミトコンドリアを単離した. 単離ミトコンドリアを SDS-PAGE で展開し、Western blotting を行うことで, 各膜透過装置のタンパク量を検出した.

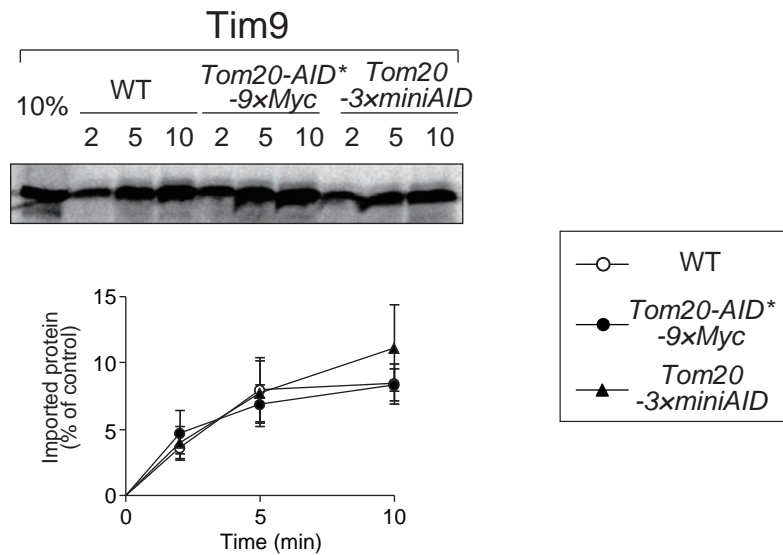


図 28 Tom20 欠損ミトコンドリアの in vitro タンパク質取り込み実験のコントロール実験.

(図 27) でタンパク量を確認した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルした Tim9 とともに 25℃ で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。Tim9 は輸送が Tom20 に依存しないと知られている (ネガティブコントロール)。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメーキングにより解析した。10 % は取り込み反応に使用した基質の 10% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *Tom20-AID*-9xMyc*, 黒三角 (▲) は *Tom20-3 xmini-AID* ミトコンドリアを使った場合を表す。

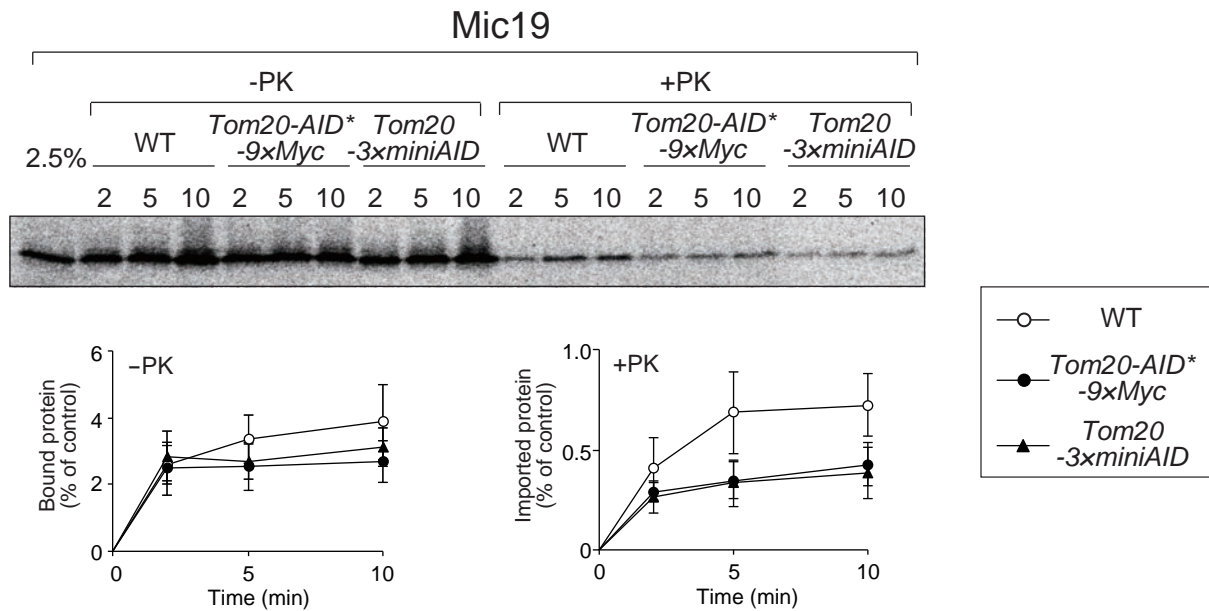


図 29 Tom20 欠損ミトコンドリアの Mic19 の in vitro タンパク質取り込み実験
 (図 27,28) で使用した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち, RI ラベルしたコントロールタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った. +PK のサンプルではこののち PK 消化を行った. PK 消化を行わなかったサンプル (−PK) および PK 消化を行ったサンプルの両方とも, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメージングにより検出を行った., ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し, SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した. 2.5 % は取り込み反応に使用した基質の 2.6% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し, 白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *Tom20-AID*-9xMyc*, 黒三角 (▲) は *Tom20-3 xmini-AID* ミトコンドリアを使った場合を表す.

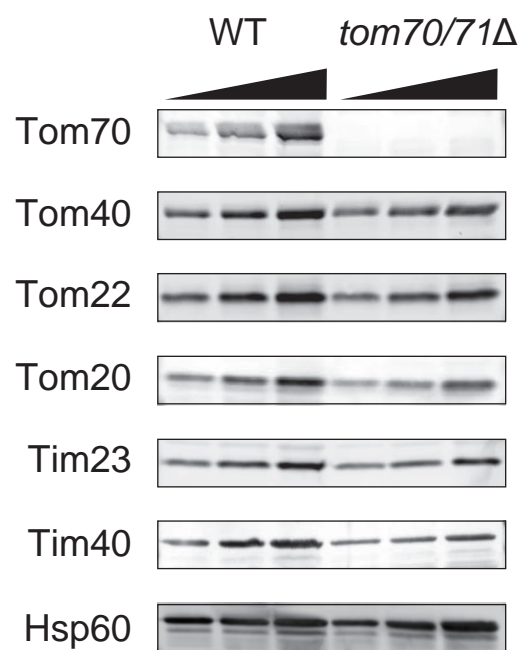


図 30 W303-1A (WT) および *tom70/71* 株から単離したミトコンドリアのタンパク質量の確認.

W303-1A (WT) 株 および *tom70/71* 株を, 0.05% グルコースを含むラクテート培地を用いて 23°C で培養した, 培養した株からミトコンドリアを単離したのち, これらの単離ミトコンドリアを SDS-PAGE で展開し、Western blotting を行うことで, 各膜透過装置のタンパク量を検出した.

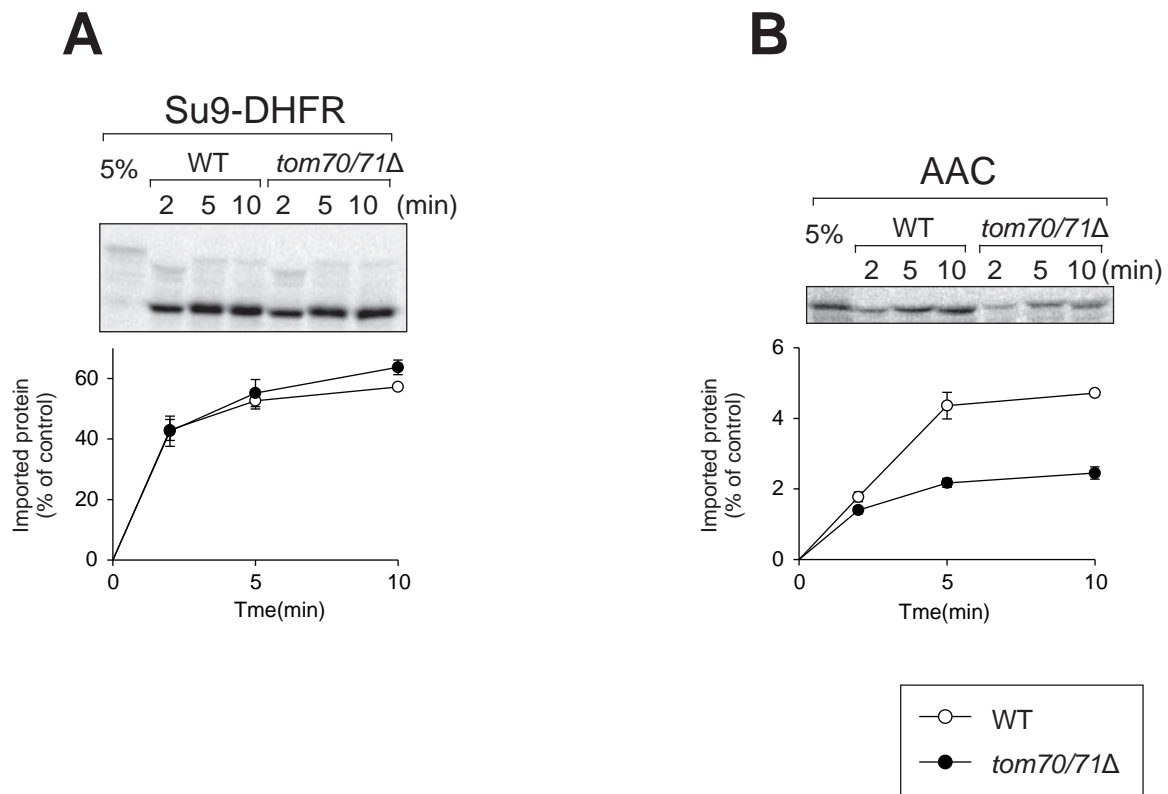


図 31 *tom70/71* ミトコンドリアでの in vitro タンパク質取り込み実験のコントロール実験.

(図 30) でタンパク量を確認した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたコントロールタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *tom70/71* ミトコンドリアを使った場合を表す。

A. 輸送が Tom70/71 に依存しないと知られている Su9-DHFR を基質として用いた (ネガティブコントロール)。B. 輸送が Tom70/71 に依存する AAC を基質として用いた (ポジティブコントロール)。

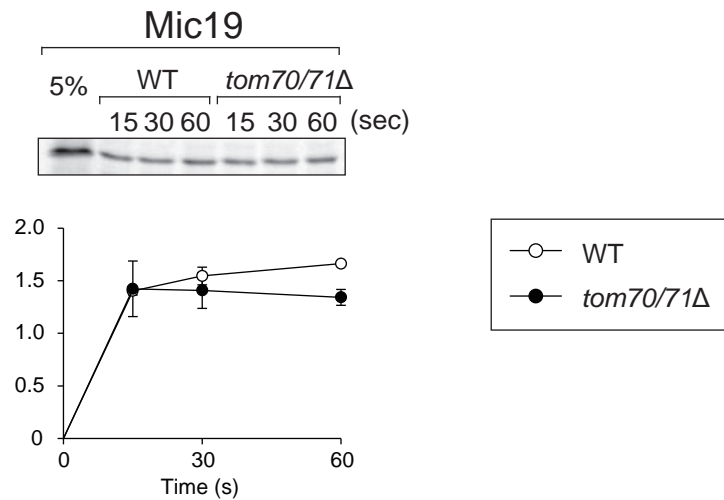


図 32 *tom70/71* ミトコンドリアでの Mic19 の in vitro タンパク質取り込み実験
 (図 31,32) で使用した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメージングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は *tom70/71* ミトコンドリアを使った場合を表す。

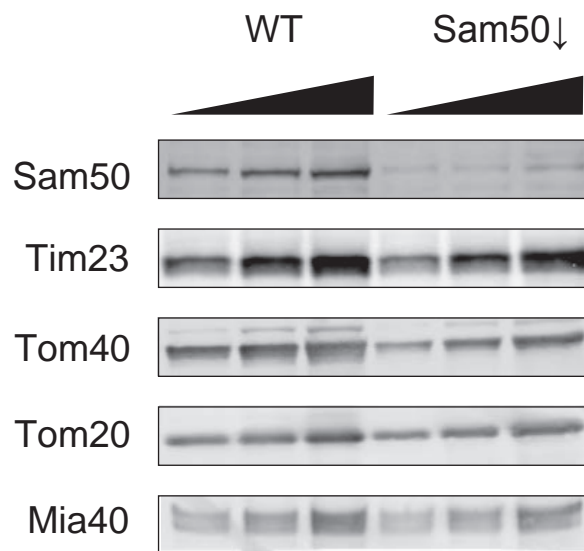


図 33 W303-1A (WT) および *GAL-sam50* 単離ミトコンドリアのタンパク質量の確認.

W303-1A (WT) 株 および *GAL-sam50* (Sam50↓) 株を, GAL プロモーターの下流にある遺伝子の発現を抑制する 0.3% グルコースを含むラクテート培地で 48 時間, 30°C で培養した後, ミトコンドリアを単離した. 単離ミトコンドリアを SDS-PAGE で展開し、Western blotting を行うことで, 各膜透過装置のタンパク量を検出した.

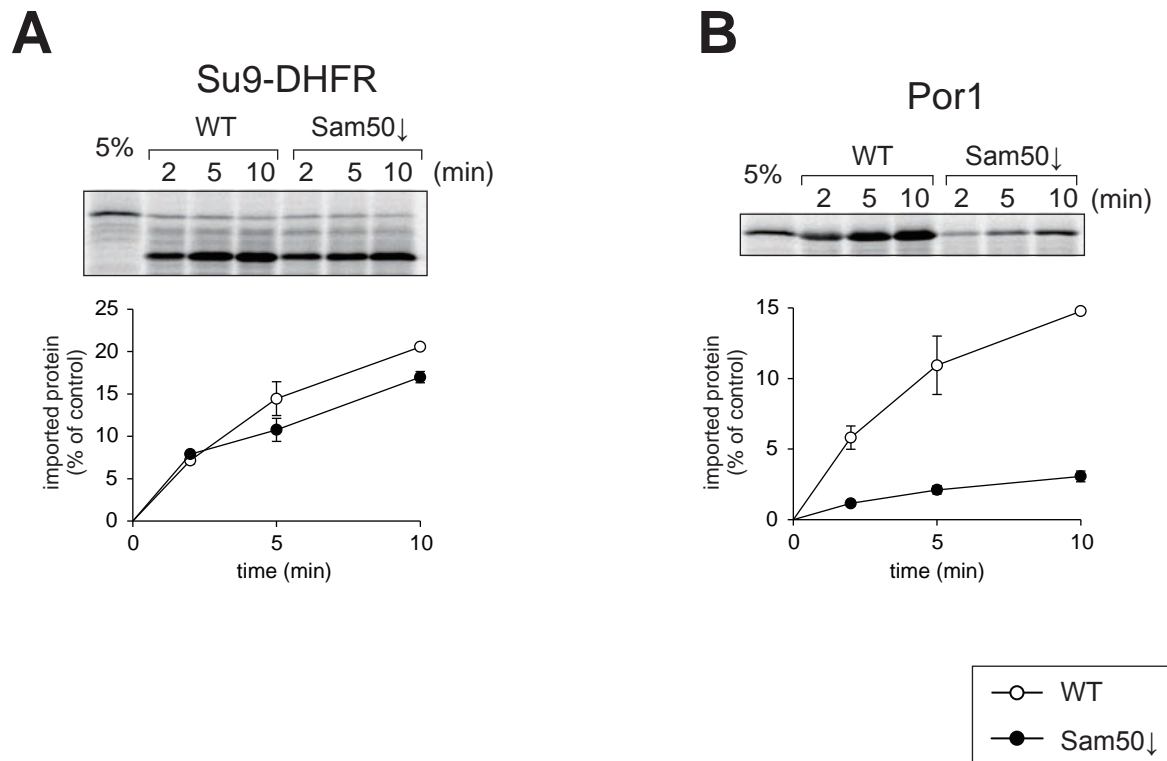


図 34 SAM50 欠損ミトコンドリアでの in vitro タンパク質取り込み実験のコントロール実験.

(図 33) でタンパク量を確認した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたコントロールタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメーキングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は Sam50↓ミトコンドリアを使った場合を表す。

A. 輸送が SAM 複合体に依存しないと知られている Su9-DHFR を基質として用いた (ネガティブコントロール)。B. 輸送が SAM 複合体に依存する Por1 を基質として用いた (ポジティブコントロール)。

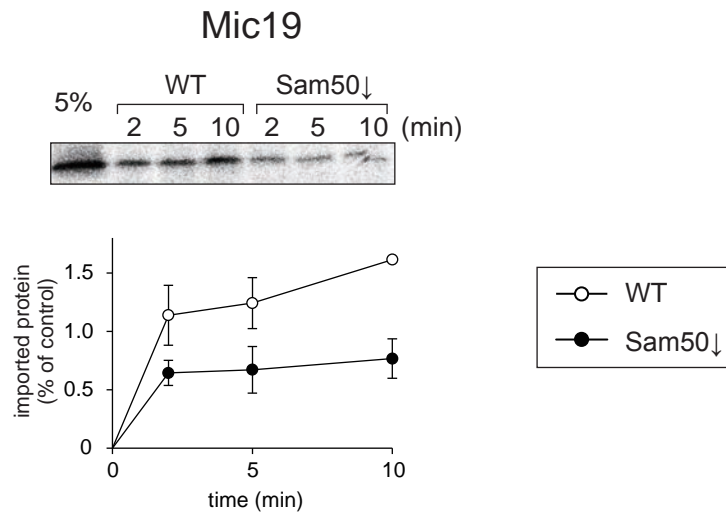


図 35 SAM50 欠損ミトコンドリアでの Mic19 の in vitro タンパク質取り込み実験 (図 33,34) で使用した単離ミトコンドリアをプレインキュベートしたのち、RI ラベルしたタンパク質とともに 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った。インキュベート後に PK を加え、ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し、SDS-PAGE で展開・ラジオイメーキングにより解析した。5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し、取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した。エラーバーは標準誤差 (n=3) を表し、白丸 (○) は WT ミトコンドリアを使った場合、黒丸 (●) は Sam50↓ミトコンドリアを使った場合を表す。

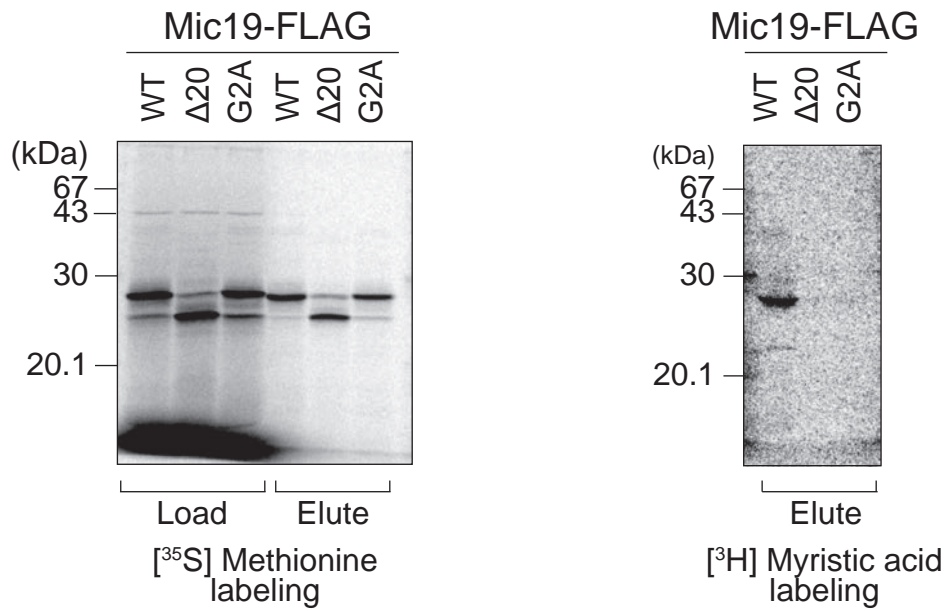


図 36 Mic19 の in vitro ミリストイル化検定.

A. Mic19 野生型 (WT) あるいはその N- ミリストイル化モチーフ変異体 (G2A, Δ20) を ³⁵S メチオニン存在下で合成した (Load). こののち FLAG タグによる共免疫沈降実験を行いサンプルの濃縮を行った (Elute).

B. Mic19 野生型 (WT) あるいはその N- ミリストイル化モチーフ変異体 (G2A, Δ20) を ³H ミリスチン酸下で合成したのち FLAG タグによる共免疫沈降実験を行いサンプルの濃縮を行った (Elute).

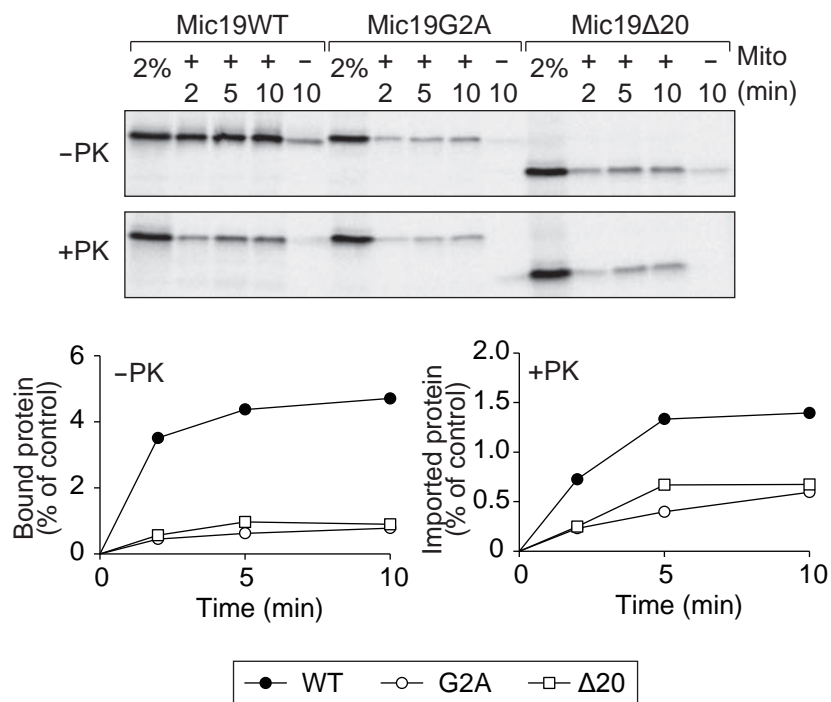


図 37 Mic19 野生型および N- ミリスチル化モチーフ変異体の in vitro タンパク質取り込み実験.

RI ラベルした各タンパク質を単離ミトコンドリア存在下 (Mito+), あるいはミトコンドリア非存在下 (Mito-) で, 25℃で一定時間インキュベートをして取り込み反応を行った. 半量はインキュベート後に PK を加え, ミトコンドリア内に取り込まれなかった各タンパク質を消化し (+PK), 半量は PK 消化は行わなかった (-PK). これらのサンプルを SDS-PAGE で展開しラジオイメージングにより解析した. 2 % は取り込み反応に使用した基質の 2% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. 黒丸 (●) は Mic19WT、白丸 (○) は Mic19G2A を, 白四角 (□) は Mic19Δ20 を表す.

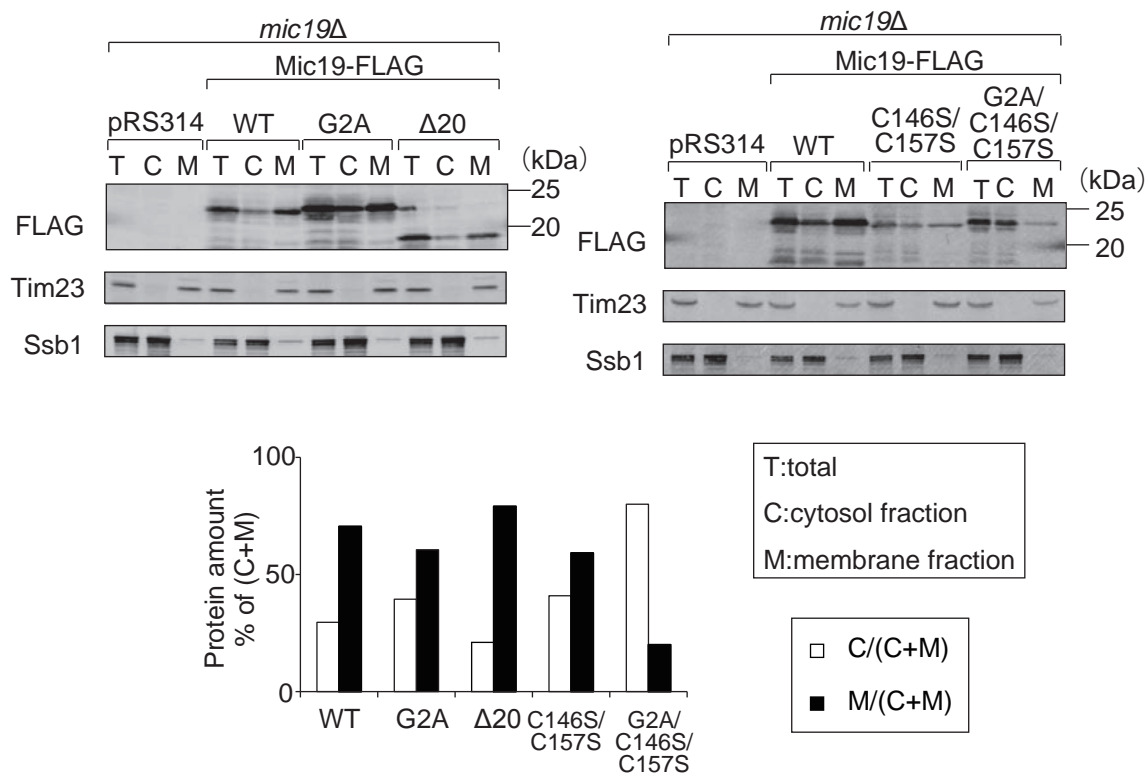


図 38 Mic9 野生型および N- ミリストイル化モチーフ変異体, システイン変異体の in vivo での局在化解析.

mic9Δ株に各 Mic9-FLAG を発現するプラスミドを導入した酵母株を作成し, この酵母株で膜分画を行うことで Mic9-FLAG の局在を調べた. T は分画前のサンプル, C は細胞質画分, M は膜画分を表す. グラフの作成の際には細胞質画分と膜画分の合計量を 100 %とし, 計算を行った.

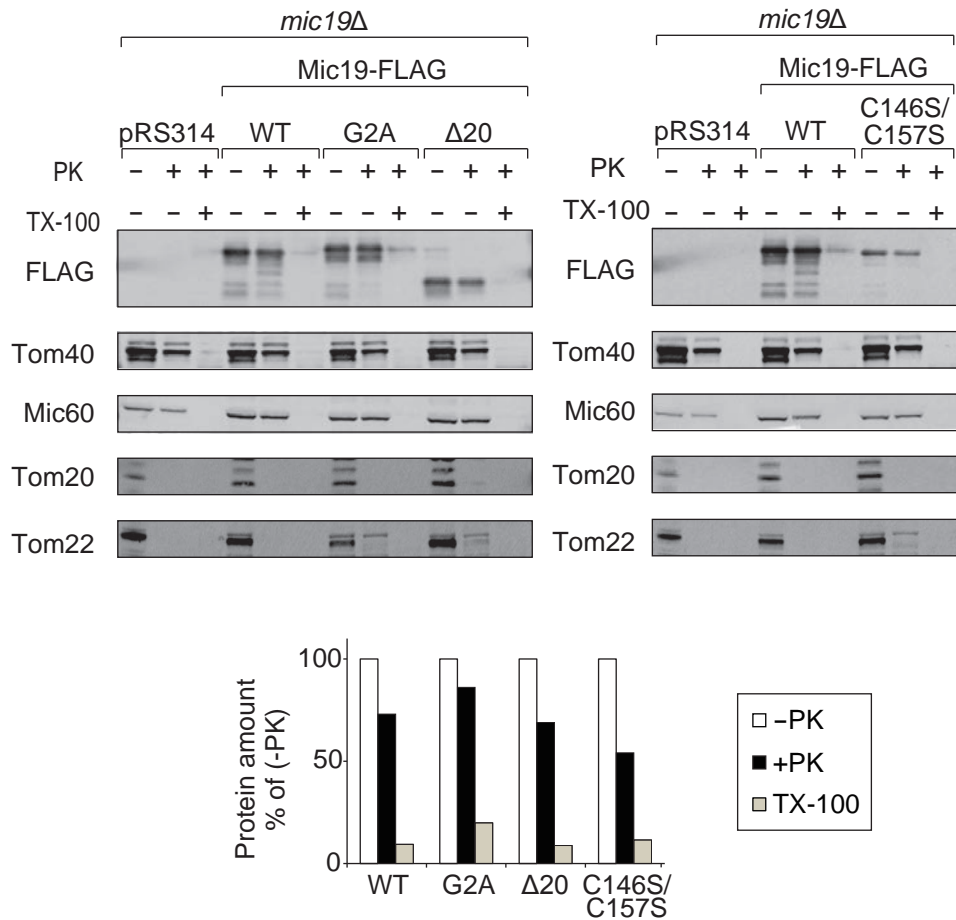


図 39 Mic9 野生型および N- ミリスチル化モチーフ変異体，システイン変異体の *in vivo* での PK 消化実験.

mic9Δ 株に各 Mic9-FLAG を発現するプラスミドを導入した酵母株を作成し，この酵母株からミトコンドリアを単離した．単離したミトコンドリアを PK 消化し，ミトコンドリア内へ取り込まれた量を評価した．この際，TX-100 を 1 % 加え，ミトコンドリア膜を可溶化し，Mic9-FLAG 自身が PK 耐性になっていないかの評価も行った．

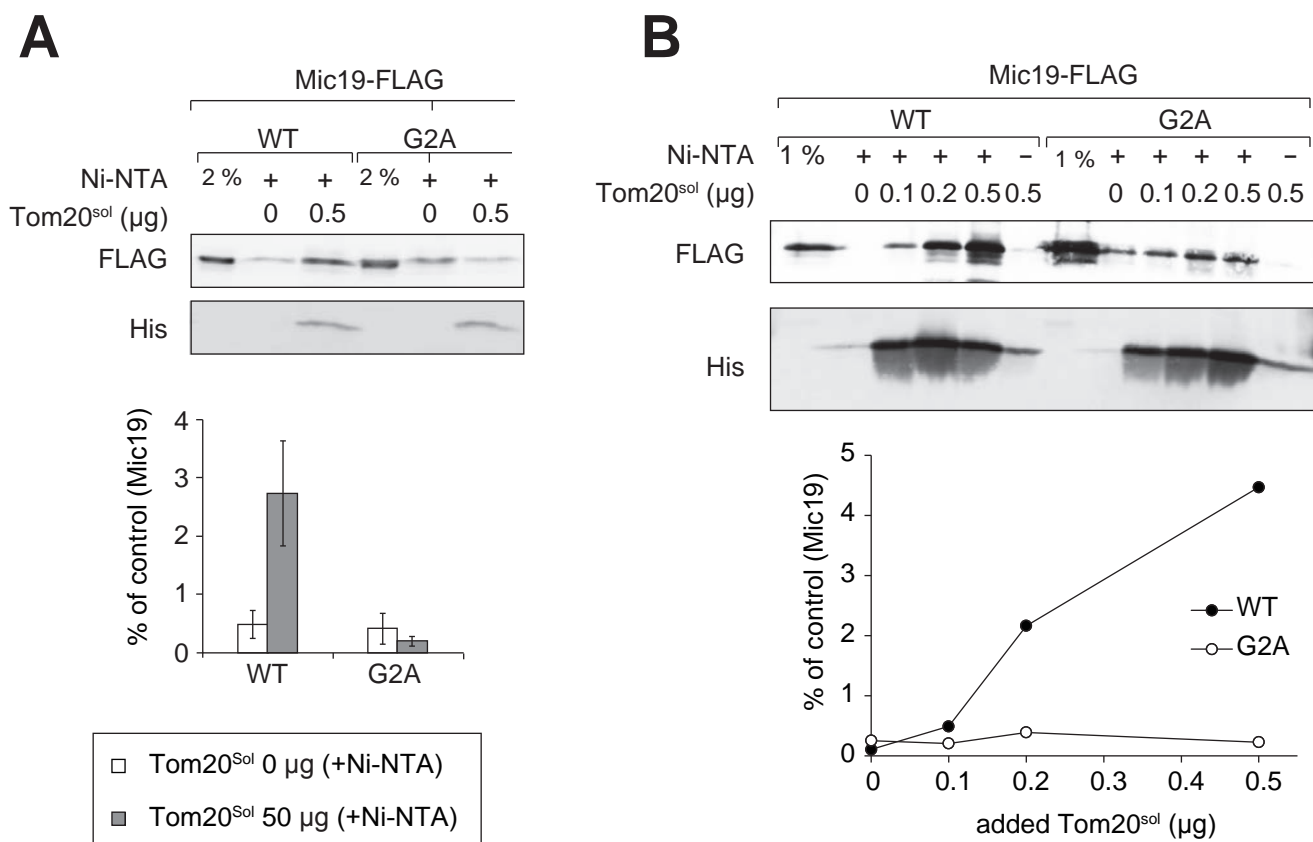


図 40 Tom20 と Mic19 の結合実験.

Tom20 の可溶制度メインの N 末端に His タグを付加した, 特定の濃度の His-Tom20^{sol} を Ni-NTA と混合し結合させた. この Ni-NTA と Mic19WT-FLAG あるいは Mic19G2A-FLAG ミトコンドリアと混合し, アフィニティー精製を行った. このサンプルをウエスタンブロッティングにより検出を行い, Tom20 と Mic19 の結合の評価を行った.

A. NI-NTA に結合させる His-Tom20^{sol} を 0μg あるいは 0.5 μg として実験を行った. 2 % は結合実験に用いた単離ミトコンドリアの量の 2% を表し, 結合実験に用いた単離ミトコンドリアの各 Mic19-FLAG の量を 100 % としてグラフを作成した. エラーバーは標準誤差 (n=3) を表す.

B. NI-NTA に結合させる His-Tom20^{sol} の量を複数点取り, 実験を行った. この際, NI-NTA を加えないサンプルも同時に行った. 1% は結合実験に用いた単離ミトコンドリアの量の 1% を表し, 結合実験に用いた単離ミトコンドリアの各 Mic19-FLAG の量を 100 % としてグラフを作成した. 黒丸 (●) は Mic19WT-FLAG を, 白丸 (○) は Mic19G2A-FLAG をあらわす.

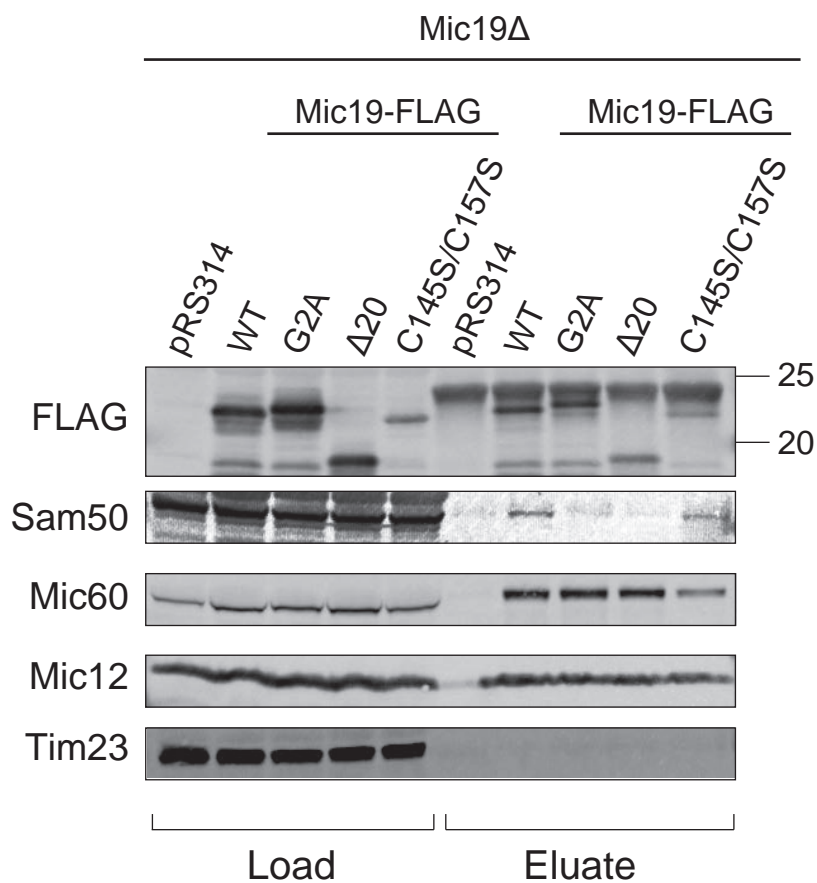


図 . 41 Sam50 と Mic19 の結合実験.

Mic19 Δ に各 Mic19-FLAG を発現させた株からミトコンドリアを単離したのち、このミトコンドリアを 1 % ジギトニンで可溶化した (Load). ジギトニンでの可溶化後のサンプルを用いて、抗 FLAG アガロースを用いて共免疫沈降実験を行った (Eluate). このサンプルを用いて各抗体によりウェスタンブロッティングを行い、検出を行った.

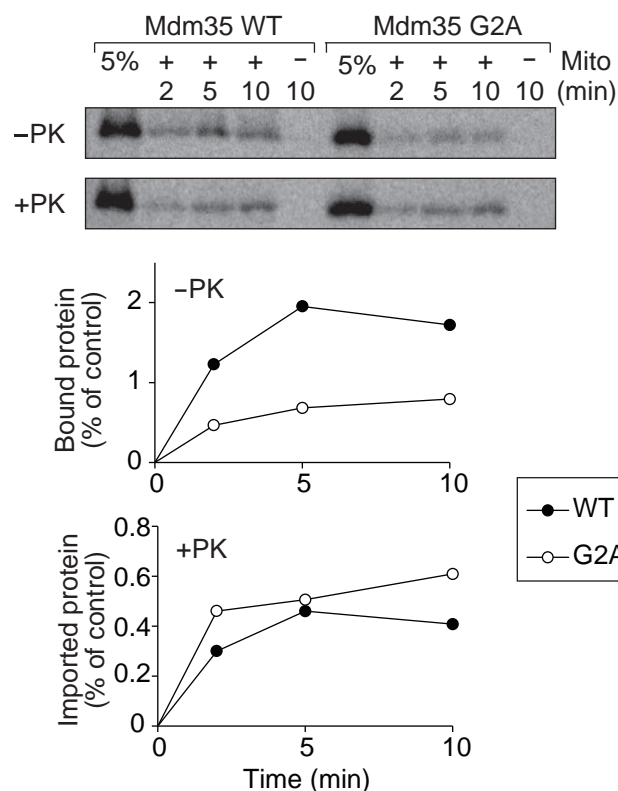


図 42 Mdm35 WT とその N- ミリストイル化モチーフの変異体の in vitro タンパク質取り込み実験.

RI ラベルした Mdm35 の野生型 (WT) あるいはその N- ミリストイル化モチーフ変異体である Mdm35 G2A を, 単離ミトコンドリアを混合し, 25℃で一定時間インキュベートすることでミトコンドリアへと取り込ませた. +PK のサンプルではこののち PK 消化を行った. PK 消化を行わなかったサンプル (-PK) および PK 消化を行ったサンプルの両方とも, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメージングにより検出を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した.

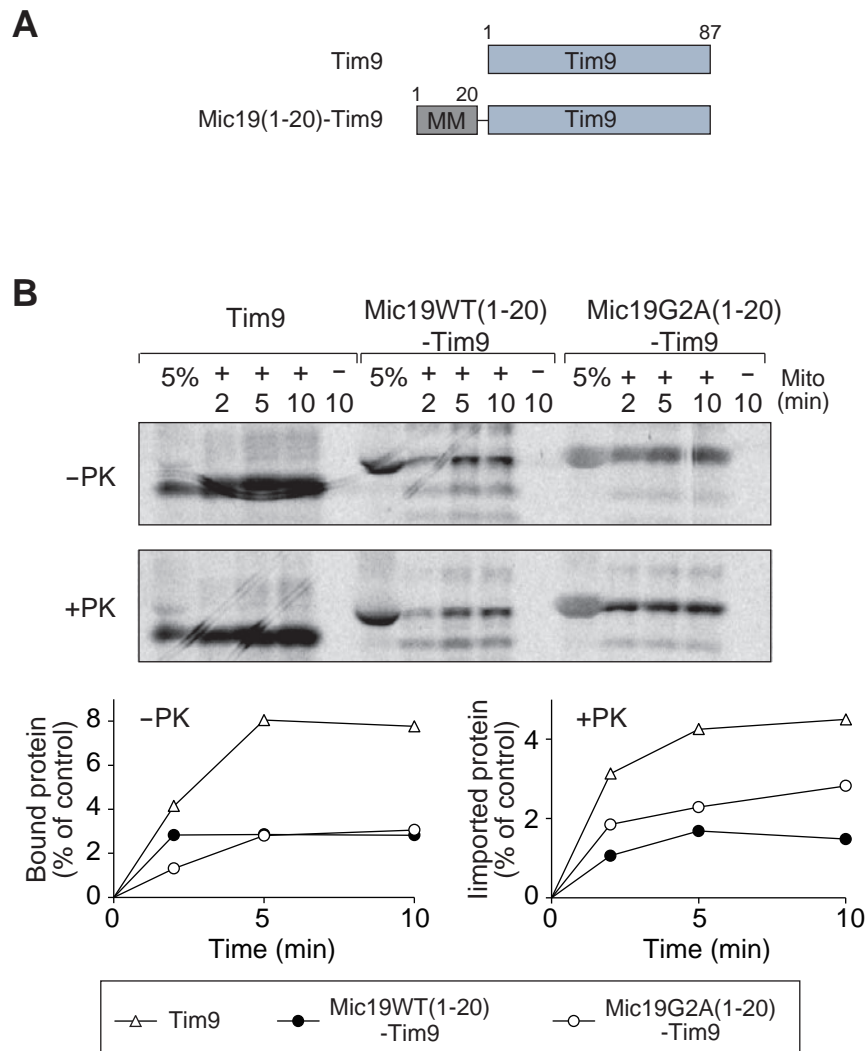


図 43 Tim9 とその N 端に Mic19 N- ミリストイル化モチーフを付加した融合タンパク質を用いた in vitro タンパク質取り込み実験.

A. Tim9 あるいはその N 端に Mic19 N- ミリストイル化モチーフを付加した融合タンパク質 (Mic19(1-20)-Tim9) のアミノ酸配列の模式図.

B. RI ラベルした Tim9 あるいは Mic19 WT(1-20)-Tim9, Mic19 G2A(1-20)-Tim9 を, 単離ミトコンドリアと混合し, 25℃で一定時間インキュベートすることでミトコンドリアへ取り込ませた. +PK のサンプルではこののち PK 消化を行った. PK 消化を行わなかったサンプル (-PK) および PK 消化を行ったサンプルの両方とも, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメージングにより検出を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. 白三角 (△) は Tim9 を, 黒丸 (●) は Mic19 WT(1-20)-Tim9, 黒三角 (▲) は Mic19 G2A(1-20)-Tim9 を使った場合を表す.

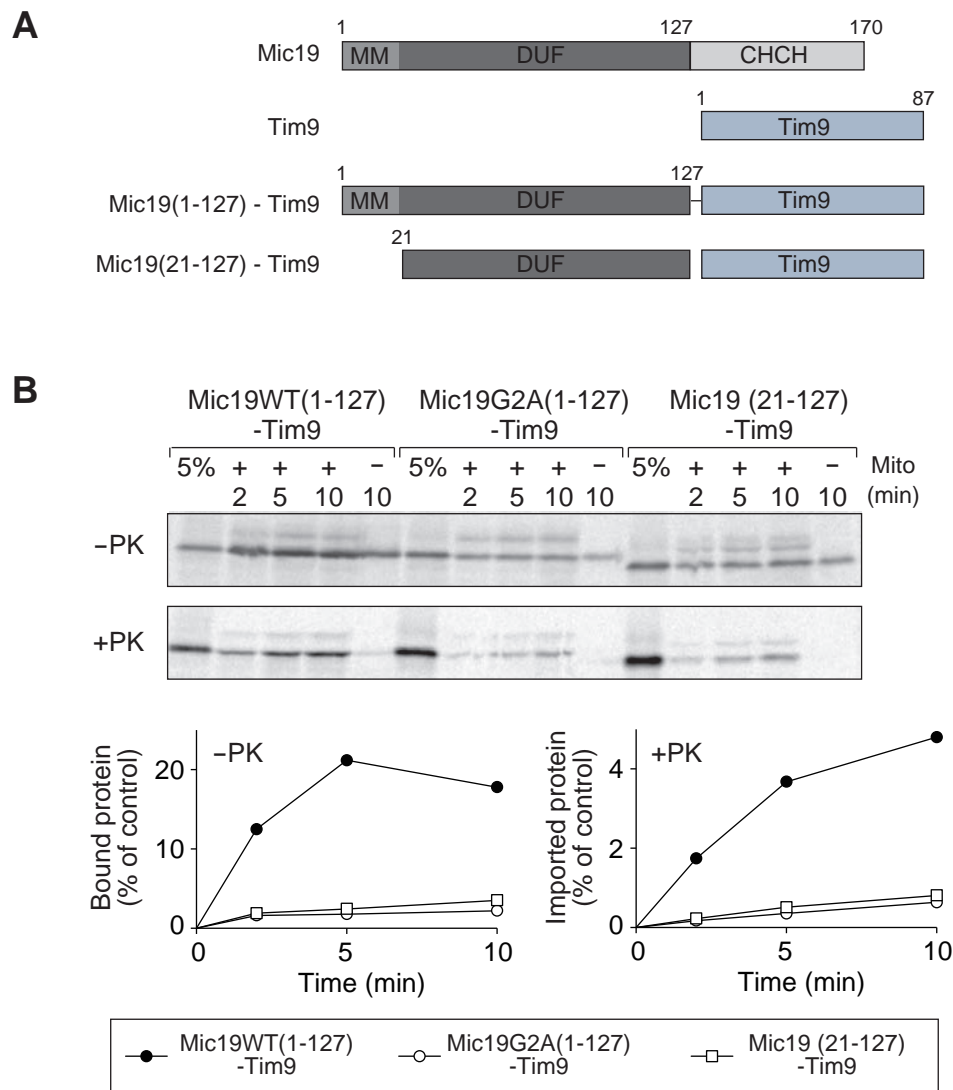
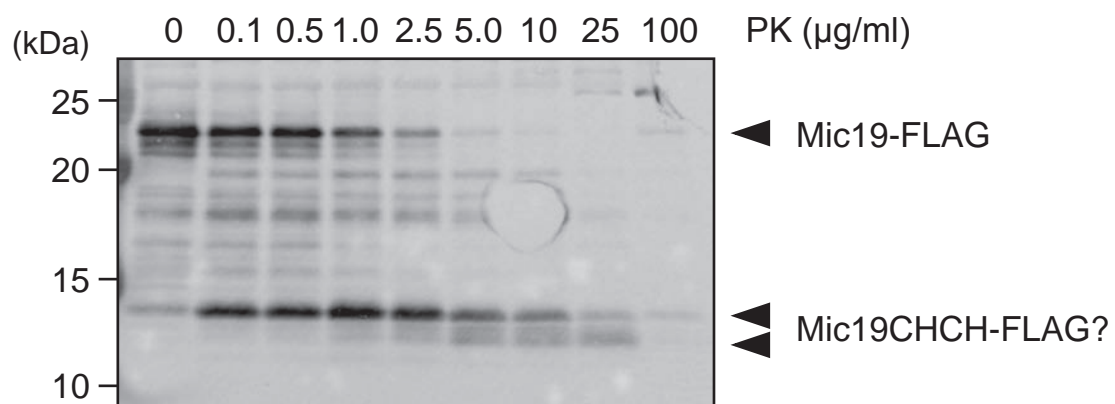


図 44 DUF ドメインと Tim9 の融合タンパク質を用いた in vitro タンパク質取り込み実験.

A. Mic19 と Tim9, Tim9 の N 端に Mic19 N- ミリストイル化モチーフと DUF ドメインを付加した融合タンパク質のアミノ酸配列の模式図.

B. RI ラベルした Mic19 WT(1-127)-Tim9, Mic19 G2A(1-127)-Tim9 を, Mic19 (21-127)-Tim9 をそれぞれ単離ミトコンドリアと混合し, 25°C で一定時間インキュベートすることでミトコンドリアへと取り込ませた. +PK のサンプルではこののち PK 消化を行った. PK 消化を行わなかったサンプル (-PK) および PK 消化を行ったサンプルの両方とも, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメージングにより検出を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5 % を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. 黒丸 (●) は Mic19 WT (1-127)-Tim9 を, 白丸 (○) は Mic19 G2A(1-127)-Tim9, 白四角 (□) は Mic19 G2A(1-20)-Tim9 を使った場合を表す.

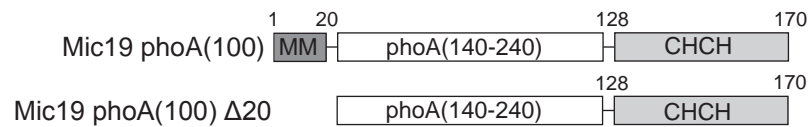


Mic19-FLAG	22 kDa
CHCH-FLAG	9.8 kDa

図 45 Mic19WT--FLAG の PK 消化実験.

Mic19WT-FLAG 株から単離したミトコンドリアを 1% TX-100 により可溶化したのち、PK を加えタンパク質消化を行った。このサンプルを TCA 沈殿により回収し、SDS-PAGE により展開した。こののち FLAG 抗体を用いて immuno blotting を行った。

A



B

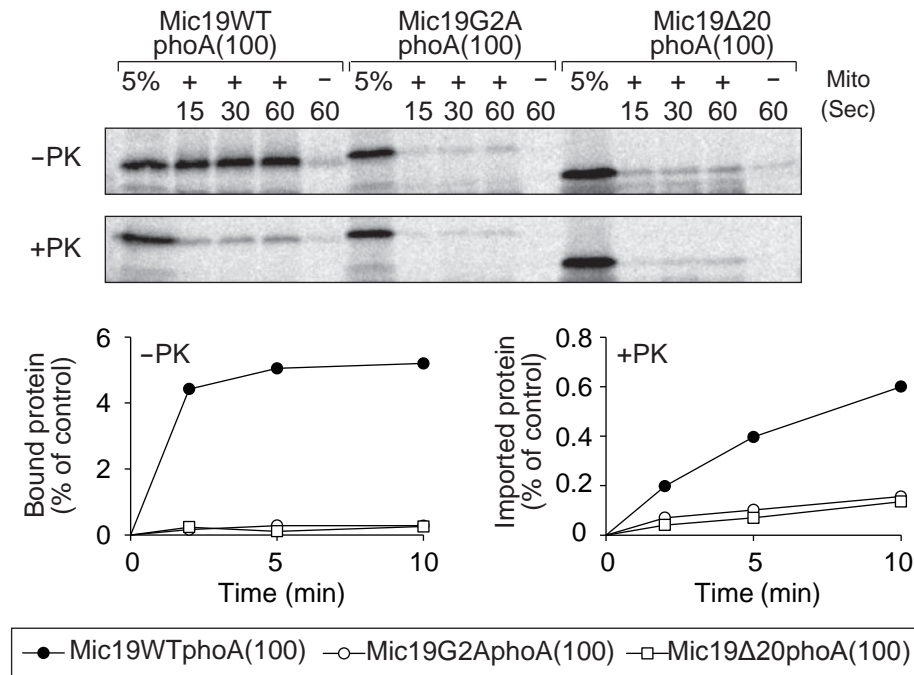


図 46 DUF ドメインを phoA に置き換えた融合タンパク質を用いた in vitro タンパク質取り込み実験.

A. Mic19 の DUF ドメインを phoA に置き換えた融合タンパク質のアミノ酸配列の模式図.

B. RI ラベルした Mic19WT phoA (100) , Mic19G2A phoA (100), Mic19Δ20 phoA (100) をそれぞれ単離ミトコンドリアと混合し, 25℃で一定時間インキュベートすることでミトコンドリアへと取り込ませた. +PK のサンプルではこののち PK 消化を行った. PK 消化を行わなかったサンプル (−PK) および PK 消化を行ったサンプルの両方とも, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメージングにより検出を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. 黒丸 (●) は Mic19WT phoA を、白丸 (○) は Mic19G2A phoA, 白四角 (□) は Mic19Δ20 phoA を使った場合を表す.

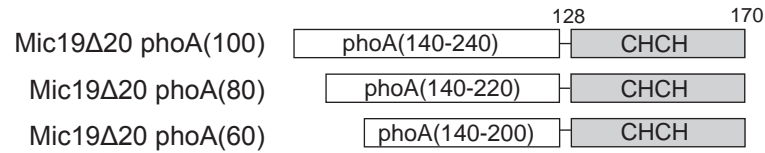
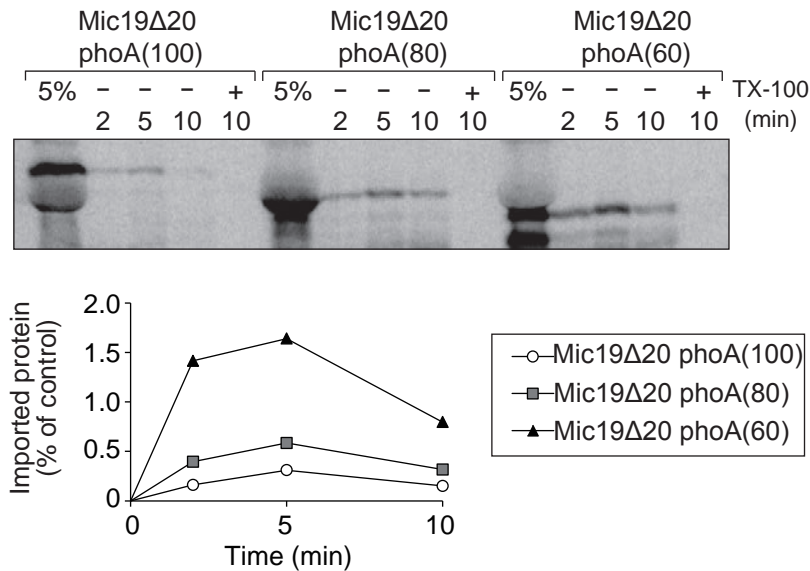
A**B**

図 47 phoA 融合タンパク質の長さを変化させた変異体を用いた in vitro タンパク質取り込み実験.

A. Mic19 の DUF ドメインを phoA に置き換え phoA の領域の長さを変化させた融合タンパク質のアミノ酸配列の模式図.

B. RI ラベルした Mic19Δ20 phoA (100) , Mic19Δ20 phoA (80), Mic19Δ20 phoA (60) をそれぞれ単離ミトコンドリアと混合し, 25℃で一定時間インキュベートすることでミトコンドリアへ取り込ませた. +PK のサンプルではこののち PK 消化を行った. PK 消化を行わなかったサンプル (-PK) および PK 消化を行ったサンプルの両方とも, SDS-PAGE により展開し, ラジオイメーjingにより検出を行った. 5 % は取り込み反応に使用した基質の 5% を表し, 取り込みに用いた基質を 100 % としてグラフを作成した. 白丸 (○) は Mic19 WT(1-127)-Tim9 を、灰四角 (■) は Mic19 G2A(1-127)-Tim9, 黒三角 (▲) は Mic19 G2A(1-20)-Tim9 を使った場合を表す.

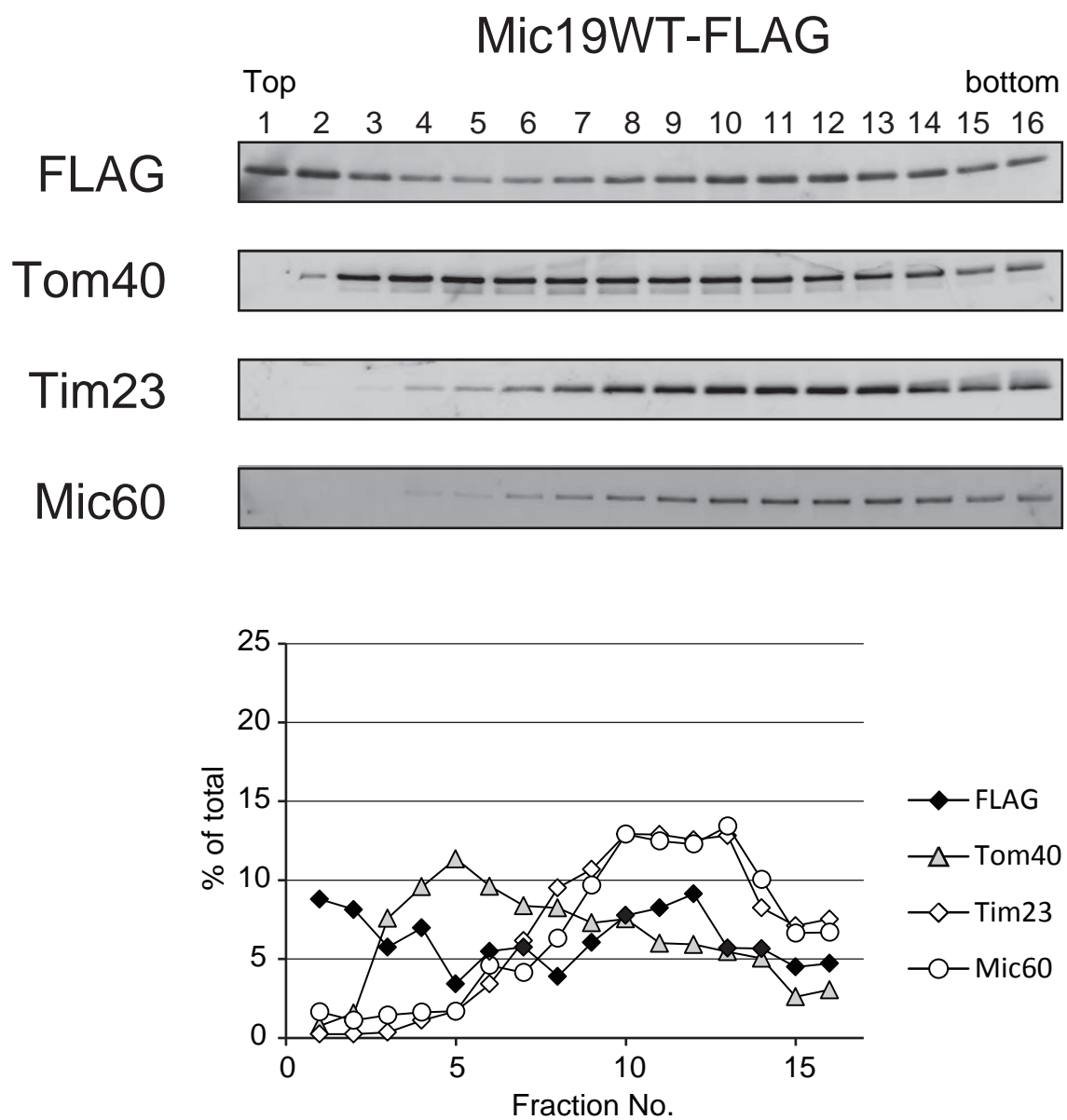


図 48 Mic19WT-FLAG ミトコンドリアを用いた密度勾配遠心による外膜・内膜の分画.

Mic19WT-FLAG を発現する株から単離したミトコンドリアを用いてショ糖密度勾配遠心を行った. 密度勾配遠心後, サンプルを回収し, ウエスタンブロッティングを行うことにより各タンパク質の検出をした.

Mic19G2A-FLAG

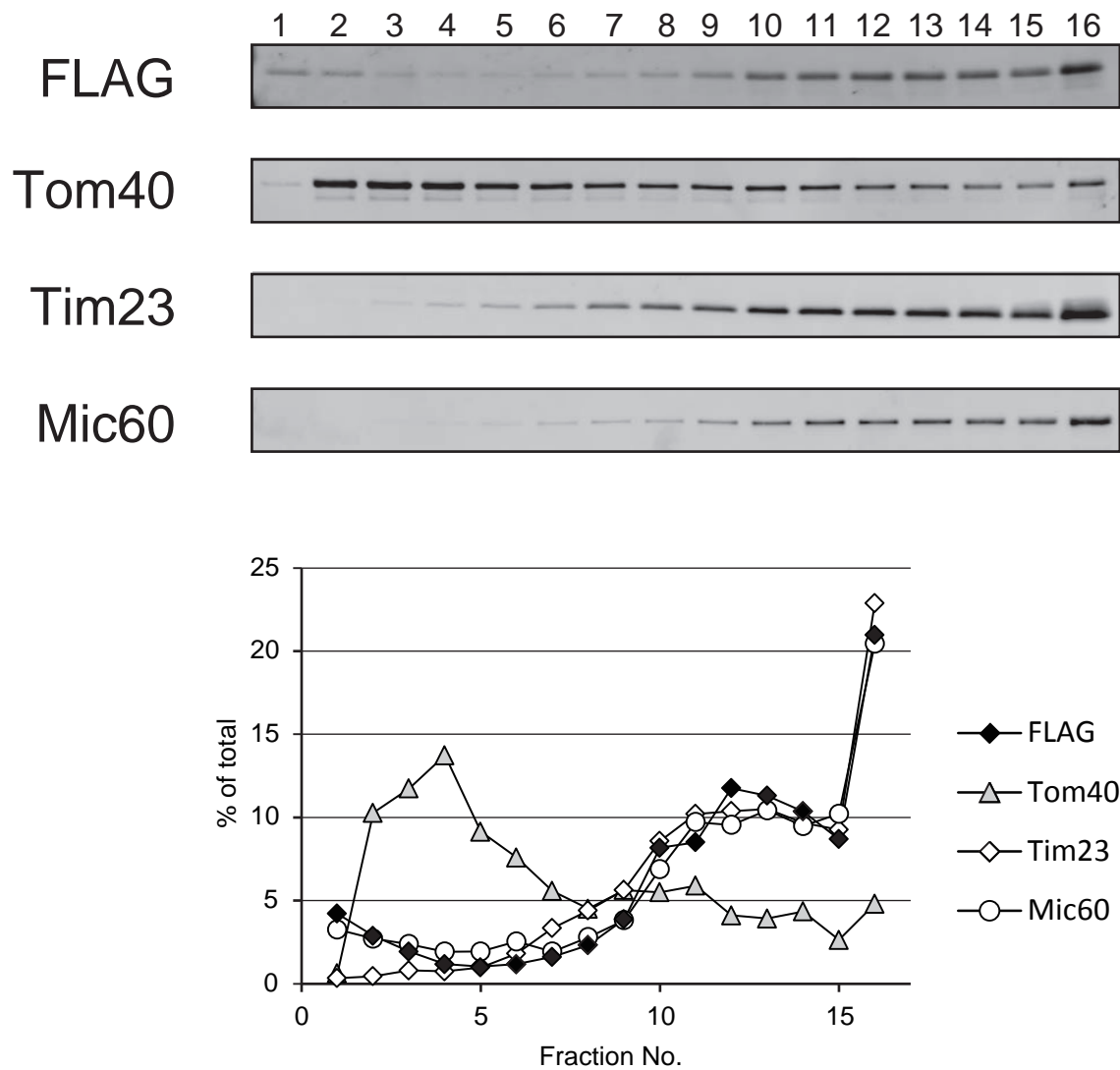


図 49 Mic19G2A-FLAG ミトコンドリアを用いた密度勾配遠心による外膜・内膜の分画.

Mic19G2A-FLAG を発現する株から単離したミトコンドリアを用いてショ糖密度勾配遠心を行った. 密度勾配遠心後, サンプルを回収し, ウェスタンブロッティングを行うことにより各タンパク質の検出をした.

Mic19C146S/C157S-FLAG

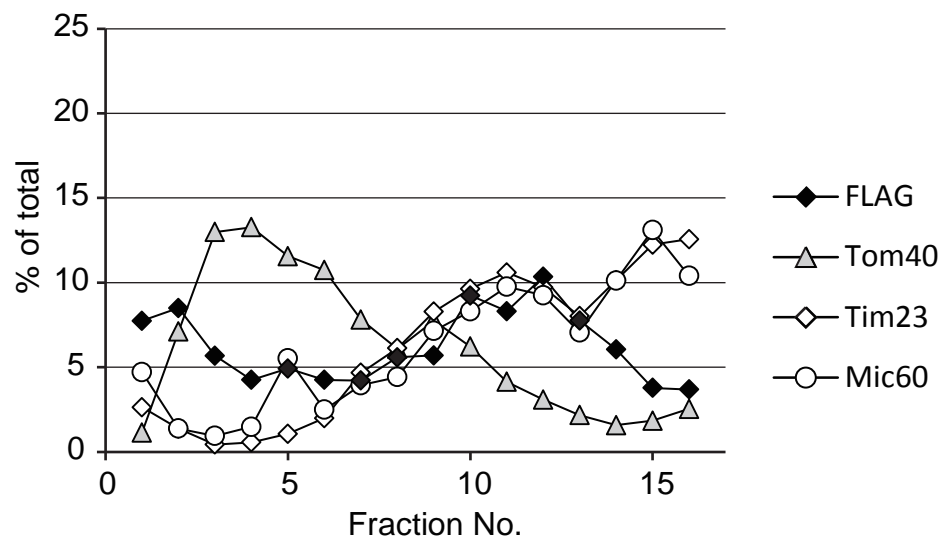
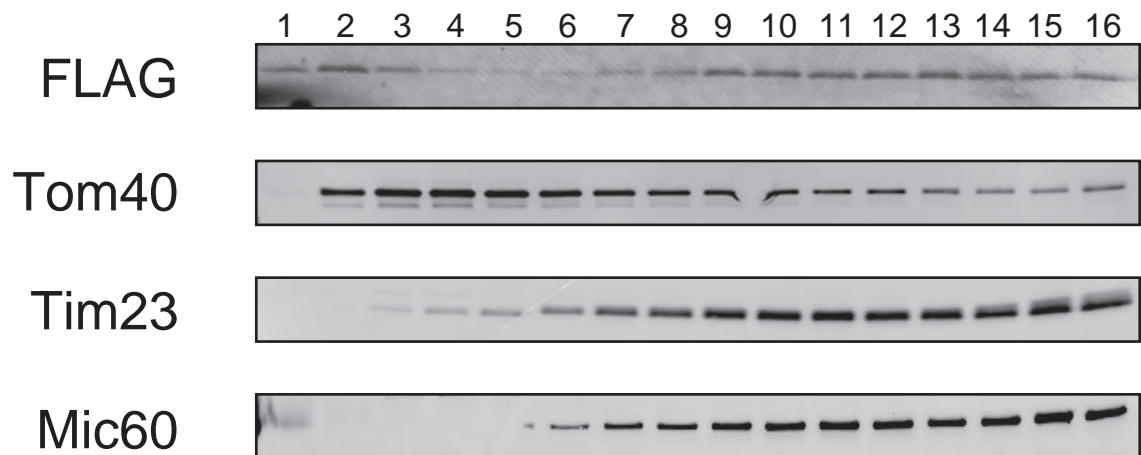


図 50 Mic19C146S/C157S-FLAG ミトコンドリアを用いた密度勾配遠心による外膜・内膜の分画.

Mic19C146S/C157S-FLAG を発現する株から単離したミトコンドリアを用いてショ糖密度勾配遠心を行った. 密度勾配遠心後, サンプルを回収し, ウェスタンブロッティングを行うことにより各タンパク質の検出をした.

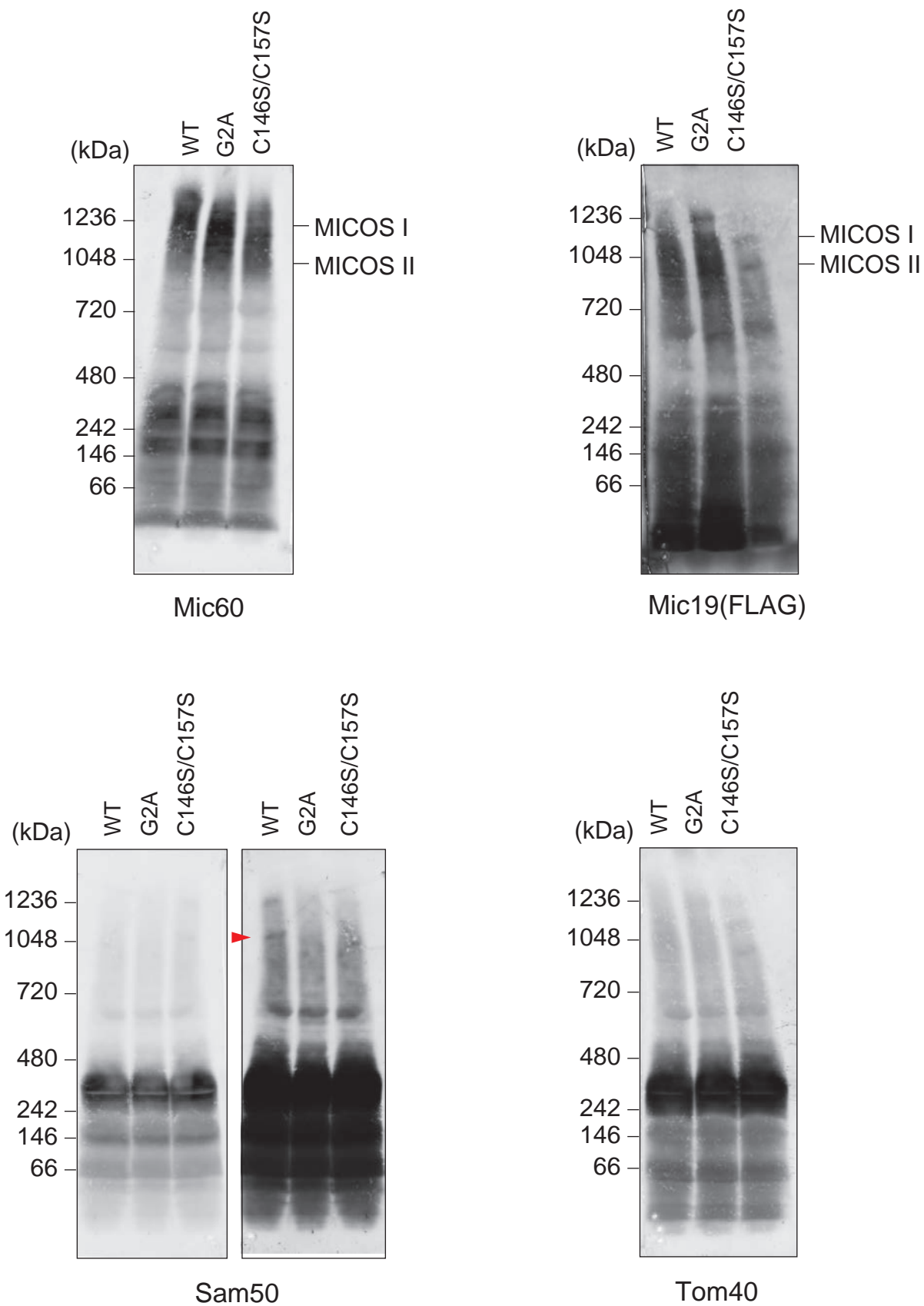


図 51 Mic19-FLAG ミトコンドリアを用いた BNE による複合体解析.

各 Mic19-FLAG を発現する株から単離したミトコンドリアを 1 % ジギトニンで可溶化したのち, BNE で展開した. こののちウエスタンブロッティングを行い検出をした.

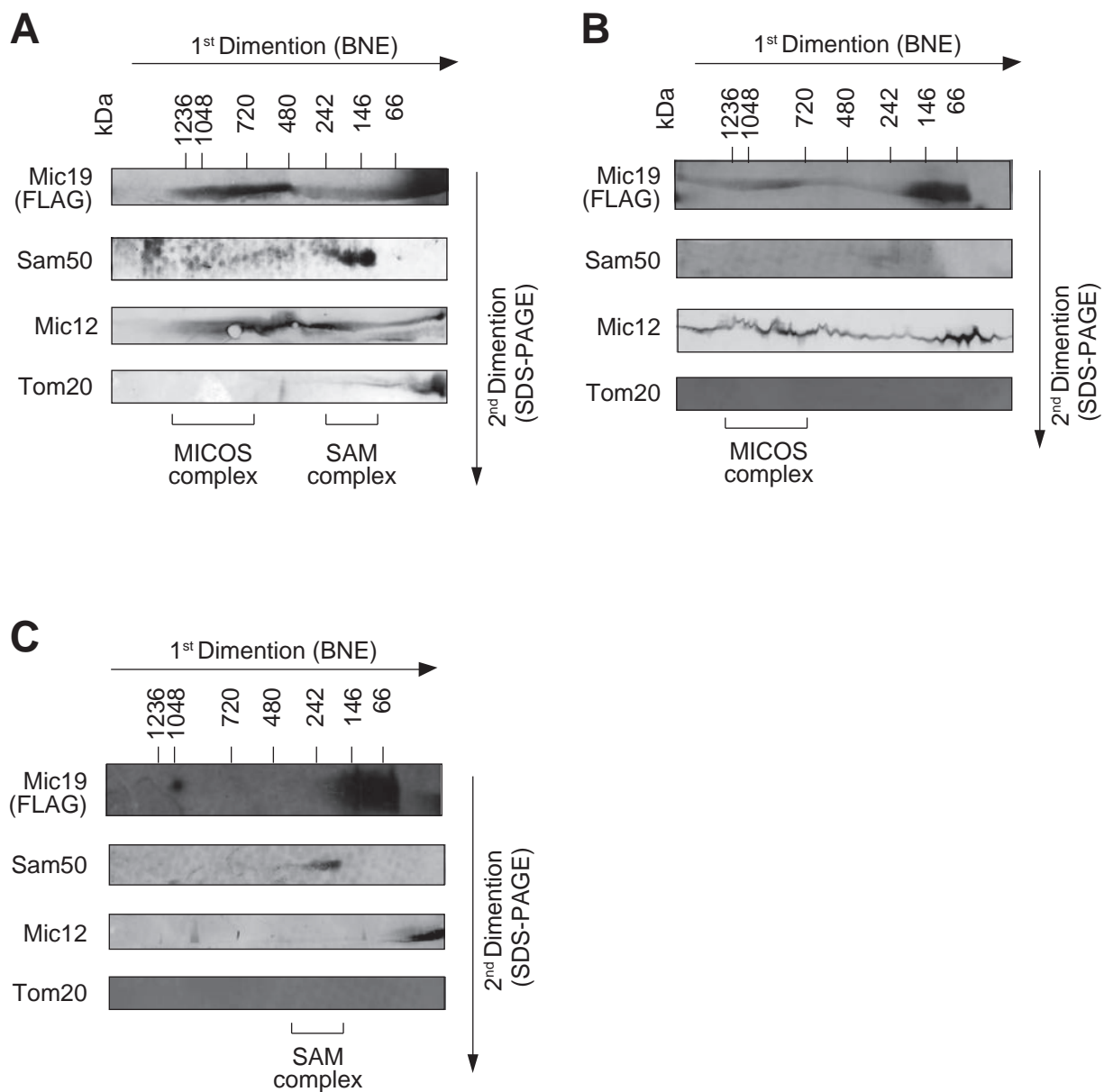


図 52 Mic9-FLAG ミトコンドリアを用いた共免疫沈降実験後のサンプルの二次元電気泳動.

各 Mic9-FLAG を発現する株から単離したミトコンドリアを 1 % ジギトニンで可溶化したのち、抗 FLAG-agarose により共免疫沈降実験を行った。FLAG ペプチドで溶出したサンプルを BNE で展開した後、SDS-PAGE を行う二次元電気泳動をした。こののちウエスタンブロッティングを行い検出をした。

A. Mic9 Δ Mic9WT-FLAG 株から単離したミトコンドリアを使った場合。

B. Mic9 Δ Mic9G2A-FLAG 株から単離したミトコンドリアを使った場合。

C. Mic9 Δ Mic9C146S/C157S-FLAG 株から単離したミトコンドリアを使った場合。

4. 考察

本研究では MCOS 複合体構成因子のミトコンドリアへの輸送を中心に解析を行った. 特に MICOS 複合体構成因子のうち, 唯一の表在性内膜タンパク質である Mic19 のミトコンドリアへの輸送機構を詳細に解析した.

4.1 MICOS 複合体構成因子のミトコンドリアへの輸送機構

内膜に局在する MICOS 複合体構成因子のうち内在性膜タンパク質は, 1 回膜貫通型タンパク質の Mic12 と Mic60, 二回膜貫通型タンパク質の Mic10, Mic26, Mic27 の 5 つである. これらの因子はすべて TIM23 複合体によりミトコンドリア内膜へと運ばれることが本研究により明らかになった. 加えて, その輸送は $\Delta\Psi$ に依存するものの, マトリクスへの輸送を担うモータータンパク質である Ssc1/mtHSP70 は関与しないこともわかった. これらの結果から, 内膜に局在する内在性膜タンパク質の MICOS 複合体構成因子は, TIM23 複合体のレセプター因子である Tim50 により認識されたのち, Tim23/17 がつくるチャンネルに入り, そこで膜貫通配列が認識されて膜透過が停止し, チャンネルから内膜へとラテラルにリリースされると考えられる (stop transfer 機構).

Mic60 の N 末端 1-18 番目のアミノ酸残基はプレ配列であることが予想されていたが, 本研究の *in vitro* でのミトコンドリアへの取込実験で, 実際に N 末端ペプチドがマトリクスに移行後切断されて分子量が小さくなり, プレ配列の存在が明らかになった. またミトコンドリアへの取込は $\Delta\Psi$ が必須で, $\Delta\Psi$ が存在しないとまったくミトコンドリアには取り込まれない. したがって Mic60 の輸送は, Tim50 によるプレ配列の認識を経て, 膜電位依存的に TIM23 複合体の膜透過チャンネルに移行したのち, 膜貫通領域の疎水性配列が仕分けシグナルとして認識され, チャンネルがラテラルに開いて内膜にリリースされると考えられる. これは典型的な TIM23 複合体による内膜への組込機構 (stop transfer 機構) にあたる. 一方, Mic12 の N 末端にはプレ配列は予想されず, 実際 *in vitro* でのミトコンドリアへの取り込み前後で分子量が変わらない. 加えて, ミトコンドリア内膜への輸送は $\Delta\Psi$ に依存するものの, $\Delta\Psi$ が消失しても取込は完全には阻害されず, 一部は輸送される. このような Mic12 の輸送と似た傾向を示す一回膜貫通型として, F_1F_0 -ATPase のサブユニットである Su e が報告されている[69]. Su e は, 一般的なミトコンドリア内膜に局在する一回膜貫通型タンパク質よりも分子量が小さく, N 末端にプレ配列を持たない. また, Su e では, N 末端から数えて 8 番目の Arg が内膜へのシグナルとして働き, この Arg はちょうど膜貫通領域の始まりに位置する. Mic12 でも Arg が 9 番目に存在し, この位置は膜貫通領域の始まりにあたることから, Su e と同様のミトコンドリア移行シグナルとして働くことが想定される (図 53).

本研究では, 二回膜貫通型タンパク質である Mic10, Mic26, Mic27 のうち, Mic10 については, 仕分けシグナルが 2 つの膜貫通領域の間にある正電荷アミノ酸であることを見出した. Mic10 は, $\Delta\Psi$ がなくても輸送が完全に阻害されないことから, TIM23 複合体による内膜への挿入機構は Mic12 と似た機構で行われることが推測される. Mic26 や Mic27 でも輸送が $\Delta\Psi$ に完全に依存しなかったことから, Mic10 と同様の機構で内膜へと運ばれていることが予想される. Mic26 は膜貫通領域の間に存在する 139-141 番目のアミノ酸は正電荷を持つ Arg であり, また, Mic27 でも膜貫通領域の間に存在する

128 番目のアミノ酸は Lys であり, 129 番目のアミノ酸は Arg である(図 53). これまで, ミトコンドリア内に存在する二回膜貫通型タンパク質の輸送に関する詳しい解析はあまり行われてこなかったが, N 末端にプレ配列をもつ 6 回膜貫通型タンパク質である Mdl1 について, 膜貫通領域の欠損変異体として二回膜貫通型タンパク質の輸送過程の解析が行われている[70]. Mdl1 の膜貫通領域を 2 つしか持たない欠損変異体の Mdl1 TM1-2 では, Mic10 と同様に, モータータンパク質群である Ssc1 は輸送に関与せず, TIM23 複合体だけでミトコンドリア内膜へ組み込まれる. したがって, TIM23 複合体によりミトコンドリア内膜に運ばれる二回膜貫通型タンパク質の輸送機構は, MICOS 複合体の因子固有のものではなく, より一般的なものであると考えられる.

4.2 Mic19 のシステインを介した輸送機構

以前での研究で, Mic19 は TOM 複合体を介して外膜を透過し, TIM40/Mia40 経路によりミトコンドリア膜間部に輸送されることが報告されている [12]. 本研究では Mic19 のアミノ酸配列 157 番目の Cys が Mia40/Tim40 と分子間ジスルフィド結合をつくることでサイトゾルへの逆戻りが防がれ, Mic19 がミトコンドリア膜間部に運ばれることを明らかにした. さらに輸送後には, 146 番目の Cys と 157 番目の Cys が分子内ジスルフィド結合を作ることがわかった. Mia40 により運ばれるタンパク質は, 通常は 4 つのシステインを含むツイン CX₉C あるいはツイン CX₃C モチーフ(X は任意のアミノ酸)をもつことが知られている. しかし哺乳動物の Mic19 でツイン CX₉C モチーフを持つが, 酵母はこのモチーフを持たない(図 25 A). 哺乳動物と出芽酵母の Mic19 のアミノ酸配列を比較すると, 酵母 Mic19 では哺乳動物 Mic19 の CX₉C モチーフの中心の 2 つの Cys 残基が保存され Mic19 と分子間ジスルフィド結合をつくること, CX₉C モチーフの外側の Cys は Ser と Leu に置換していることがわかった. これらのことから, Mia40 によって運ばれるタンパク質の輸送シグナルは, ツイン CX₉C あるいは CX₃C モチーフが絶対的なものではなく, 中央の Cys のみが必須であると考えられる.

4.3 Mic19 の N-ミリストイル化モチーフを介した輸送機構

本研究では, 酵母 Mic19 の局在化に N-ミリストイル化が関与することを示した. さらに酵母 Mic19 に付加されたミリストイル基は, ミトコンドリア外膜, TOM 複合体のレセプターである Tom20, 外膜の β バレル型膜タンパク質の輸送をおこなう SAM 複合体の Sam50 と相互作用することがわかった. Tom20 については, Mic19 と相互作用するのは Tom20 のサイトゾル側のドメインなので, ミトコンドリア内へと取り込まれる前に Mic19 と Tom20 とが相互作用し, ミトコンドリアへの輸送を促進すると考えられる. Sam50 との相互作用に関しては, 哺乳動物では Mic60-Mic19-Sam50 複合体がクリステジャンクション形成に関与することが示唆されていることから, 膜間部側で Sam50 と相互作用することにより Mic19 が安定化し, 膜間部への輸送が間接的に促進したと考えられる.

興味深いことに, *in vitro* タンパク質取り込み実験による解析により, N-ミリストイル化によるミトコンドリアへの輸送促進は Mia40 により運ばれるタンパク質すべてで見られるわけではなく, Mic19 に特異的であることがわかった. Mic19 は Mia40 で運ばれるほかのタンパク質と比較すると分子量が大きく, Mia40 と結合する Cys を含む CHCH ドメインの N 側に DUF ドメインと呼ばれる領域をもち, この領域

がミトコンドリアへの輸送を阻害していることがわかった。DUF ドメインは特定の高次構造をとらず、さらにこの阻害は、DUF ドメインの配列に依存して引き起こされるのではなく、高次構造をとらないドメインであれば同様の阻害を引き起こすこと、そして阻害は配列ではなく長さによりのみ依存することが分かった。以上のことをまとめると、CHCHドメインの N 末端にある DUFドメインの存在が Mic19 のミトコンドリアへの輸送効率を減少させ、N-ミリストイル化がこの効果を相殺するといえる。それではなぜ、Mic19 の N-ミリストイル化によるミトコンドリア外膜への結合や Tom20 との結合は、DUF ドメインによる輸送の阻害を抑制するのだろうか。

一般に、TIM40/MIA 経路で輸送されるタンパク質は、サイトゾルではジスルフィド結合を形成しないためコンパクトな高次構造をとっておらず、コンホメーションエントロピーは高い状態にある。外膜透過の際に、この TIM40/MIA に認識されるドメインが Tom40 の狭いチャネルへと入ることは、可能なコンホメーション数が制限されることによるエントロピーの減少を伴うため、熱力学的には不利である(図 54, ステップ 1)。このエントロピーの減少は、基質ペプチドが Tom40 チャネルの内側と相互作用することや、この弱い結合に引き続いて起こる Tom40 チャネルの出口の膜間部に存在する Mia40 との相互作用に伴うエンタルピーの増加により、相殺される。(図 54, ステップ 2)。さらに、Mia40 が Tom40 チャネルの出口で結合した基質ポリペプチドは、外膜近傍で取り得るコンホメーションが制限された空間から、より広い膜間部の空間へと移動することに伴うエントロピー増加でも駆動されると考えられる(「entropic pulling」と呼ばれる機構)[71]。Mic19 の輸送は MIA40 に認識される CHCHドメインの前に特定の高次構造をとらない DUF ドメインが存在することにより阻害されるが、これは長い高次構造をとらないドメインがあることによるコンホメーション数の増大、すなわちコンホメーションエントロピーの増大により、CHCHドメインが Tom40 チャネルの狭い空間に入ることが格段に不利になるためと考えられる(図 54, ステップ 3)。N 端に付加されたミリストイル基は、ミトコンドリア外膜そのものへの結合および Tom20 への結合を促進し、DUF ドメインと外膜および TOM 複合体とを近接させる(図 54, ステップ 4)。このことで、広いサイトゾル空間にあるときと比べて DUFドメインがとりうるコンホメーション数は減少し(排除体積効果)、コンホメーションエントロピーは低下する。このため、サイトゾルから直接 Tom40 チャネルに入ることはエントロピー的に大きな差があるため不利であったが(図 54, ステップ 3)、いったん外膜及び Tom20 に結合することでエントロピーが減少した基質が Tom40 チャネルに入ることは、エントロピー的な差が小さくなり、それほど不利にはならないと考えられる(図 54, ステップ 5)。このいわばエントロピー的に駆動された外膜透過(「entropy pushing」と呼びたい)の後に、Mic19 の CHCHドメインは通常の Mia40 の基質ポリペプチドと同様に、Mia40 により認識され、膜間部からの逆戻りが防がれるものと考えられる(図 54, ステップ 6)。Mia40 との相互作用に加えて、Mic19 のミリストイル基と SAM 複合体との相互作用も、最終的には Mic19 の膜間部への局在を促進すると考えられる。出芽酵母ではミトコンドリアへの局在化が N-ミリストイル化に依存するものは Mic19 のみしか報告されていないが、哺乳動物では、外膜の β バレルタンパク質の輸送を行う SAM 複合体の中心因子である Sam50, MICOS 複合体構成因子の Mic25, ミトコンドリアの品質管理機構であるマイトファジーに関与する AMPK β などのミトコンドリアへの局在化にミリストイル基が必要であるとの報告がある [★72,73]。したがって、N-ミリストイル化によるミトコンドリア移行の促進は Mic19 のみに見られるのではなく、一般的な

シグナルとして働く可能性がある。

4.4 Mic19 のシステインと N-ミリストイル化モチーフの役割について

酵母 Mic19 は, Mia40 によりミトコンドリアに運ばれ, 膜間部で分子内ジスルフィド結合が形成されることが考えられる。以前の研究では, Mic19 の 146 番目あるいは 157 番目の Cys を Ala に置換した変異体では, Mic19 が他の MICOS 複合体構成因子と相互作用できず, クリステジャンクションの形成が阻害されることが報告されている。また本研究においても, 分子内ジスルフィド結合を作れない Mic19 C146S/C157S 変異体では, Mic60 や Mic12 との相互作用が減少し, 1000 kDa 付近の MICOS 複合体が形成できないことがわかった。これらのことは, Mic19 の分子内ジスルフィド結合形成は Mic19 のミトコンドリア移行に必須であるだけでなく, MICOS 複合体形成を介したクリステジャンクション形成にも必須であることを意味する。

本研究では, Mic19 の N-ミリストイル化モチーフは SAM 複合体との相互作用に必須であるが, 他の MICOS 複合体構成因子との相互作用には N-ミリストイル化モチーフが必要ないことを明らかにした。Mic19 C146S/C157S 変異体では, Mic19 C146S/C157S 変異体と SAM 複合体から形成される超複合体と考えられる大きさの複合体が検出されたが, Mic19 WT では Mic19 と SAM 複合体から形成される超複合体以外に, 1000 kDa 以上の MICOS 複合体と SAM 複合体から形成される超複合体と考えられる分子量の複合体が検出された。このことは MICOS 複合体と SAM 複合体間の超複合体形成には, Mic19 の N 末端のミリストイル化と分子内ジスルフィド結合の両方が必要であることを示唆するものである。最近の哺乳動物細胞を使った研究では, タンパク質分解酵素の OMA1 が Mic19 の N 末端を切断すると Sam50 との相互作用ができなくなり, クリステジャンクションの形成が阻害される可能性が示唆されている[74]。本研究の図 39 でも, *in vivo* で Mic19-FLAG を発現させると, Mic19 の分解産物と考えられる分子量の低下したバンドが見られ, このバンドは Mic19 Δ 20-FLAG と同様の位置に見られる。FLAG タグが C 末端に付加されていることから, 出芽酵母でも, 何らかのタンパク質分解酵素により Mic19 の N 末端の切断が特異的に行われる可能性がある。これらのことをあわせて考えると, 出芽酵母で N 末端のミリストイル化が起こらない場合, あるいは N 末端がタンパク質分解酵素により切断された場合にも, MICOS-SAM 超複合体が作られず, クリステジャンクションの形成が阻害される可能性が考えられる。以上のことから, Mic19 の N-ミリストイル化と分子内ジスルフィド結合形成は, Sam50 や他の MICOS 複合体構成因子と相互作用に重要であり, ひいては Mic19 のこうした相互作用がミトコンドリア内でのクリステジャンクション形成や外膜-内膜コンタクト部位形成に重要であると考えられる。

<Mic12>

MSKLGPLA**RS** VKWTL SVGVI GSVFYLYRYS NNGYFYDHDA TWLKQDHQVQ DLVDRKEVVP
GETRNRKLVV TDDGTAWVRT MGESIKDIWN EQIRNSVDWI YSWGKN*

<Mic26>

MTKDFYRQLD PVEEKIVPPE NAIVISSEAK EATVNEKEAK QGVLSQRVMK YIGENELVDG
ISVRDPDYLK RFFNERRKQF SAK**WDKVTNK** IDDIAGRYYA REESFTSTIA SLHTDPNERL
IPGLLSILVA SMTG**SVLARR** **R** TWLLRATMP IILGSCCFAY AMPTTFRNTM GLIHNLEMNT
FPHFTERQDR VWKETKRLST ASVQYYYDAK KWLNKDVEKT GNAIKNWTGV NVK

<Mic27>

MVNFYDDVDE SKSHGEFPLI PVVLQNSSEL SVRTIPTGNE IIESVHLTKW LRKYRNALAS
QLDRYEKGWQ SKIANFRLQV QHVINYSRKN IFNVDSSENKH **TVVPGSLIAL** GAFFAGSIAV
NRSNWGAKRL IFGHKSSILE KLCT**SLPSRI** LLPWVLAAAT **FKYWAPQTSQ** NLVNATENDL
LPADFVKSYH NTKWRIYEEG YVAKKCDLKR QIDQTLQKNI RYAREQLYEK LEQA

図 53 Mic12, Mic26, Mic27 のアミノ酸配列.

灰色の四角で囲まれたアミノ酸は膜貫通領域, 赤字のアミノ酸はシグナルと考えられる正電荷のアミノ酸を示す.

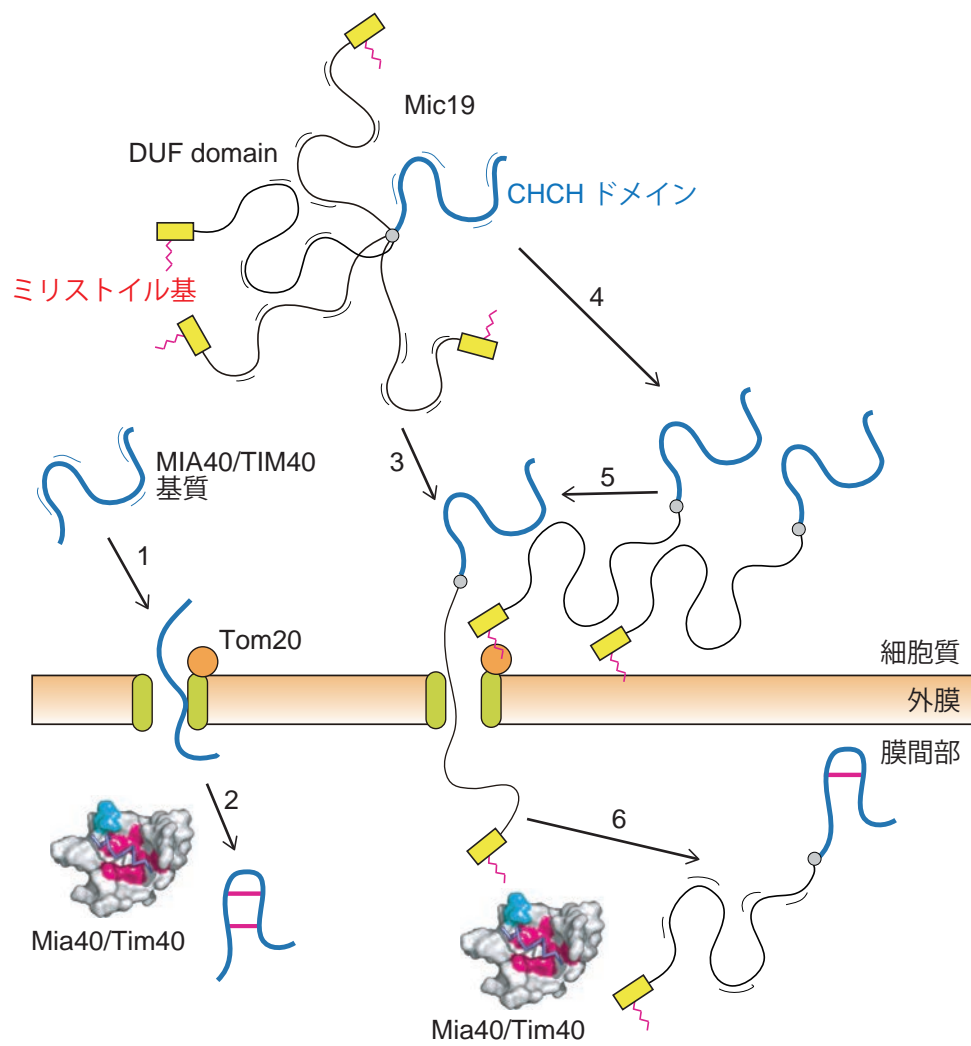


図 54 Mic19 の輸送機構のモデル図.

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、*pK83* 株を供与してくださった Elizabeth A. Crai 博士ならびに *tom70/71 Δ* 株を供与してくださった Shaw JM 博士に深くお礼申し上げます。また、多大な御指導、御助言をして下さった京都産業大学 遠藤斗志也教授，河野慎助教，山形大学 田村康准教授に深く感謝致します。抗体作製や酵母株の作製，普段の研究生活の際に遠藤研の皆様には大変お世話になりました。この場を借りて感謝申し上げます。

また，指導教官であった遠藤斗志也教授の異動後には名古屋大学 阿部洋教授とその研究室の皆様には大変お世話になりました。加えて，満期退学後にお世話になりました大阪大学 石原直忠教授，久留米大学 伴匡人講師をはじめとする石原研の皆様にもこの場を借りて感謝申し上げます。

7. 略語

AAC : ADP / ATP carrier

ATP : adenosine 5'-triphosphate

Blue Native-PAGE (BN-PAGE) : Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis

BNE : Blue Native Electrophoresis

BSA : bovine serum albumin

DHFR : dihydrofolate reductase

DNA : deoxyribonucleic acid

DTT : dithiothreitol

$\Delta\Psi$: membrane potential

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

Gal : Galactose

HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic dihydrate

IgG : immunoglobulin G

Kan : kanamycin

kDa : kilodalton

mtHsp70 : heat shock protein 70 in the mitochondrial matrix

MMC : mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone

MPP : mitochondrial processing peptidase

MOPS : 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid

NADH : β -nicotinamide adenine dinucleotide reduced form

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PAM : presequence translocase-associated motor

PCR : polymerase chain reaction

PMSF : phenylmethylsulfonylfluoride

RNA : ribonucleic acid

SDS : sodium dodecylsulfate

TCA : trichloroacetic acid

TIM : translocase of the inner membrane

TOM : translocase of the outer membrane

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

WT : wild-type