

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲 第	号
------	---	-----	---

氏 名 植田 依里

論 文 題 目 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

論文審査担当者

主 査 名古屋大学大学院理学研究科 教 授 理学博士 本間 道夫

委 員 名古屋大学大学院理学研究科 教 授 博士(理学) 阿部 洋

委 員 京都産業大学・総合生命科学部 教 授 理学博士 遠藤 斗志也

論文審査の結果の要旨

別紙 1-2

ミトコンドリアは、好気性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。このうち内膜は、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。IBM とクリステ膜の境界は、クリステジャンクション (CJ) と呼ばれる狭いチューブ構造を形成している。この CJ の形成には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最近の研究で示されている。

この MICOS 複合体は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、ミトコンドリア内膜の内性膜タンパク質 **Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, Mic60**、表在性内膜タンパク質の **Mic19** の6つの因子から構成される。これらのタンパク質はすべて核にコードされているため、サイトゾルで合成されたのち、ミトコンドリアへと運ばれる必要がある。一般的に、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、ミトコンドリア内に取り込まれる。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。しかし、**MICOS** 複合体構成因子の **TIM23** 複合体に認識されるプレ配列を持つ **Mic60** を除き、これらの膜透過装置に認識される一般的なミトコンドリア行きシグナルをもたないため、どのような機構でミトコンドリアへと運ばれているのかは不明である。

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、*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。その後、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たりすることで、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。特に、輸送に関する詳しい解析が行われてこなかったプレ配列を持たない2回膜貫通型タンパク質の **Mic10, Mic26, Mic27** についても、膜電位依存性は不完全であるものの、プレ配列を持つタンパク質と同様に **TIM23** 複合体経路で仕分けられることを明らかにすることができた。

一方、唯一の膜表在性タンパク質である **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仕分け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もわかった。構造をとらないドメインによる取り込みの阻害は、**DUF** ドメインの特定のアミノ酸配列を必要とせず、その長さのみ依存した。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ことが考えられる。また、**Mic19** のシステインや N-ミリスチル化は、ミトコンドリアへの輸送シグナルとして働くだけでなく、ほかの他の **MICOS** 複合体構成因子や **SAM** 複合体の中心因子 **Sam50** と相互作用し巨大複合体を形成することに必要であることも見いだした。最近の哺乳動物での研究で、**Mic19-Mic60-Sam50** の相互作用がクリステの形成に関与することが示されていることから、システインや N-ミリスチル化は **Mic19** の機能にも重要であることが考えられる。

以上のように本研究は、核にコードされたタンパク質のミトコンドリア内への輸送機構解明に大きな貢献をした。よって、申請者は博士(理学)の学位を授与される十分な資格があるものと認められる。