

## 第12回 北陸銀行若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名		助成金額
荒磯 裕平	医薬保健研究域保健学系・助教		700,000 円
研究課題名	ミトコンドリアへのタンパク質搬入ゲート TOM 複合体の動作メカニズムの解明		
研究の概要	<p>〔研究開始当初の背景, 研究の目的, 研究の方法等について記入〕</p> <p>TOM (Translocase of the outer mitochondrial membrane) 複合体はミトコンドリア外膜に存在する膜透過装置で、サイトゾルで合成されたミトコンドリアタンパク質の約 99%が TOM 複合体を通過してミトコンドリアへ取り込まれる。近年、クライオ電子顕微鏡解析によって TOM 複合体の高分解能立体構造が決定され、TOM 複合体の構造生物学研究は新たなフェーズに入った。本研究では、TOM 複合体が構造変換を繰り返しながら、多様な前駆体タンパク質をミトコンドリア内へ輸送する分子メカニズムを 1 分子レベルで解明することを目的として、100 ミリ秒の時間分解能とナノメートルの空間分解能で膜タンパク質の動的構造解析が可能な高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) 解析によって動作中の TOM 複合体のダイナミクスを解析した。</p>		
研究の成果	<p>〔成果の具体的内容、意義、重要性及び今後の展望等について記入〕</p> <p>【成果内容】出芽酵母より単離したミトコンドリア膜を界面活性剤で可溶化し、アフィニティ精製、ゲル濾過精製によって TOM 複合体を大量調製することに成功した。生化学的解析により、精製 TOM 複合体は Tom40、Tom22 などの主要サブユニットを有する分子量約 450kDa のヘテロ膜タンパク質複合体構造をとることが示唆された。界面活性剤条件下における TOM 複合体の挙動を HS-AFM によって解析したところ、二量体、三量体と考えられる粒子が観察された。二量体の HS-AFM 像は先行研究で解明された電顕構造ともよく一致した。さらに継時的に解析を続けることで二量体から三量体、三量体から二量体へと構造変化する様子を可視化することに成功した。</p> <p>【意義、重要性】TOM 複合体はサブユニットが頻繁に出入りする動的な膜タンパク質複合体であり、その動作機構の解明には既存の生化学解析と HS-AFM のような新しい動的構造解析手法の融合が重要である。そのため本成果は、1)二量体・三量体の構造変換における各サブユニットの動きや、2)基質タンパク質の取り込み機序を解明するための第一歩として、細胞内トラフィック研究において大きな意義を持つ。</p> <p>【展望】現在は TOM 複合体の各サブユニットの任意の位置でタグ標識、あるいは変異導入できる細胞株の樹立を試み、HS-AFM 像における各サブユニットの空間配置の決定を目指している。さらに脂質二重膜ナノディスクへ再構成した TOM 複合体に基質タンパク質を添加することで、動作中の TOM 複合体が基質タンパク質を取り込む様子を観察するための試料条件や観察条件を検討している。これらの解析により 1 分子レベルでのミトコンドリアタンパク質輸送機構を世界に先駆けて解明したい。</p>		
研究成果発表状況	<p>〔雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ等について記入〕</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>○荒磯裕平 「ミトコンドリアへのタンパク質搬入ゲート TOM 複合体の構造と機能」日本生体エネルギー研究会 第 46 回討論会、金沢、2020 年 12 月</li> <li>九笹加菜、今井大達、古寺哲幸、稲津明広、遠藤斗志也、○荒磯裕平 「高速原子間力顕微鏡を用いたミトコンドリアタンパク質搬入ゲート TOM 複合体の動的構造解析」日本生化学会北陸支部 第 39 回大会 学生講演、金沢、2021 年 6 月 (予定)</li> </ol>		
経費の執行状況	費目	事項 (主な使用事項を記載)	執行額 (円) (費目毎総額を記入)
	物品費	界面活性剤、脂質、酵素、人工遺伝子等の生化学実験汎用試薬	700,000 円
	旅費		0 円
	人件費・謝金		0 円
	その他		0 円