

## ミトコンドリアにバレル（円筒）型膜タンパク質を組み込む仕組みを解明

### ■研究体制

京都産業大学，東京大学，フライブルグ大学，産業技術総合研究所，千葉大学の研究グループの共同研究

### ■発表論文

「Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by  $\beta$ -barrel switching」

（ミトコンドリアのSAM複合体は $\beta$ -バレルタンパク質の交換を介して機能する）

### ■著者（<sup>1</sup>筆頭著者、<sup>2</sup>責任著者）（研究当時）

竹田弘法<sup>1</sup>，鈴木純子，遠藤斗志也<sup>2</sup>（京都産業大学）

包明久，吉川雅英，西澤知宏，濡木 理（東京大学）

今井賢一郎，山守 優，富井健太郎（産業技術総合研究所）

小笠原 諭，村田武士（千葉大学）

Caroline Lindau, Jon V. Busto, Lena-Sophie Wenz, Lars Ellenrieder, Sebastian P. Straub, Waltraut Mossmann, Jian Qiu, Thomas Becker, Nils Wiedemann, Nikolaus Pfanner（ドイツ・フライブルグ大学）

### ■本件のポイント

#### ・（どのような成果を出したのか）

ミトコンドリア外膜の（膜タンパク質複合体）SAM複合体について，構成サブユニット（タンパク質）が異なる二つの複合体の高分解能立体構造をクライオ電子顕微鏡解析で決定しました。

SAM複合体が構成タンパク質を入れ替えながら，基質となる膜タンパク質に円筒形（バレル型）の形を作らせつつ外膜に組み込む，新規の仕組みを明らかにしました。

#### ・（新規性（何が新しいのか））

ミトコンドリア外膜には小分子やタンパク質の通り道を提供するバレル型構造の膜タンパク質（ $\beta$ -バレル型膜タンパク質）が存在し，ミトコンドリアの機能に必須ですが，それらの膜タンパク質がどのようにバレル型をつくって膜に組み込まれるのかはこれまで不明でした。細菌の外膜にも進化的に近い組み込み装置がありますが，それとは組み込みの仕組みがかなり異なることもわかりました。

#### ・（社会的意義／将来の展望）

ミトコンドリア外膜の機能に必須の $\beta$ -バレル型膜タンパク質組み込みのメカニズムの解明により，ミトコンドリアの膜タンパク質組み込みや $\beta$ -バレル型膜タンパク質に関連する病気の治療法の開発や，ミトコンドリア膜へのタンパク質組み込みの効率を制御することで老化を防ぐなどの可能性が開けることが期待されます。

## ■概要

ミトコンドリア<sup>(注1)</sup>は細胞内で生命活動に必須のエネルギー生産を担っており、細胞にとってもヒトの健康にとっても重要な役割を果たしています。ミトコンドリアが正常に機能するためには、エネルギーの通貨である ATP や様々な代謝物質をミトコンドリアの中から外に送り出したり取り込んだり、さらにはミトコンドリアを構成するタンパク質をミトコンドリアの中に取り込むための孔となる円筒形（バレル型）の膜タンパク質（ $\beta$ -バレル型膜タンパク質<sup>(注2)</sup>）が外膜に存在することが必須です。この $\beta$ -バレル型膜タンパク質を外膜に組み込む装置として働くのが、複数のタンパク質が組み合わさってできた SAM 複合体<sup>(注3)</sup>です。今回、本研究グループは、2種類のサブユニット組成から成る SAM 複合体の精密構造をクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法<sup>(注4)</sup>で決定しました。その構造から、Sam50a, Sam50b, Sam35, Sam37 から成る SAM<sup>dimer</sup> 複合体の Sam50b が基質となる $\beta$ -バレル型膜タンパク質と入れ替わり、Sam50b と同じようなバレル型構造をつくると、今度は別のサブユニットの $\beta$ -バレル型膜タンパク質である Mdm10 のバレル型構造が基質と入れ替わることで、バレル型構造が完成した基質が SAM 複合体から解離することがわかりました。Mdm10 が再び Sam50b と入れ替わると反応サイクルの初期状態に戻ることになります。SAM 複合体はこのようにダイナミックに構成サブユニットと基質を入れ替えることで、基質のバレル型構造の形成を促すことが明らかになりました。

## ■背景

ヒトや酵母などの真核生物の細胞内には、ミトコンドリアをはじめとする膜で仕切られた細胞内小器官（オルガネラ）が存在します。ミトコンドリアは細胞内で生命活動に必要なエネルギーを産生します。そのため、ヒトではミトコンドリアが正常に機能することが健康につながり、ミトコンドリアの機能低下は老化や神経変性疾患をはじめとするさまざまな病態と関連することが知られています。ミトコンドリアは外膜と内膜の二枚の生体膜に囲まれ、1000種類以上のタンパク質から構成されており、これらのタンパク質のほとんどは、ミトコンドリアの外で合成されてからミトコンドリア内へと搬入されますが、この搬入のためにはタンパク質が通る孔が必要です。さらにミトコンドリアが正常に機能するためには、ミトコンドリア内で産生されたエネルギーの通貨である ATP や様々な代謝物質をミトコンドリアの中から外に送り出したり取り込んだりする孔も必要です。これらの孔は外膜で円筒形（バレル型）の膜タンパク質（ $\beta$ -バレル型膜タンパク質）がつくっています。

アミノ酸がつながったヒモであるタンパク質からどのようにバレル型の形をつくるのでしょうか。バレル型構造をつくるためには、タンパク質のヒモを端からジグザグに折りたたんで $\beta$ -シートという構造をつくり（ジグザグ型の1本1本を $\beta$ -ストランドと呼びます）、これを巻き上げてバレル型にします。ミトコンドリアには $\beta$ -バレル型膜タンパク質が5種類存在しますが、Sam50は16本の $\beta$ -ストランドが折りたたまれてバレル型シートをつくり、それ以外の $\beta$ -バレル型膜タンパク質は19本の $\beta$ -ストランドが折りたたまれてバレル型シートをつくることが知られています。こうしたバレル型構造の形成と同時に、このバレル型構造は脂質二分子膜から成る外膜に組み込まれねばなりません。 $\beta$ -バレル型膜タンパク質は外膜の搬入口である TOM 複合体（を構成する $\beta$ -バレル型膜タンパク質の Tom40 が作る孔）を通して膜間部に入ります。そこから外膜の SAM 複合体と呼ばれる $\beta$ -バレル型膜タンパク質の組み込み装置の働きで、膜間部側から外膜にバレル型構造をつくって組み込まれると考えられています（図1）。しかし、これまで SAM 複合体は高分解能の精密構造が決定されておらず、SAM 複合体がどのように $\beta$ -バレル型膜タンパク質を外膜に組み込んでいくのかは分かっていませんでした。

## ■研究成果

### クライオ電子顕微鏡（Cryo-EM）による SAM 複合体の精密構造決定

本研究グループは、酵母細胞から SAM 複合体を精製し、東京大学のクライオ電子顕微鏡を用いてその構造を 2.9 Å の分解能で決定しました（SAM<sup>dimer</sup> 複合体、図2）。全体構造は Sam50（これも $\beta$ -バレ

ル型膜タンパク質) 2 個, Sam35 が 1 個, Sam37 が 1 個から成る複合体でした。2 分子の Sam50 (Sam50a, Sam50b) が作るバレル型構造が 22° 傾いて並び, その上 (サイトゾル側) から Sam35 と Sam37 がよく似た構造をつくって蓋をする形になっていました。2 分子の Sam50 (Sam50a, Sam50b) はバレル型構造が完全に閉じていない「オープン型」でした。Sam50a と Sam50b の間に相互作用はほとんどなく, その位置決めは Sam35 と Sam37 が担っていました。本論文に先だって, Sam50, Sam37, Sam35 が 1 分子ずつから構成される SAM<sup>core</sup> 複合体のクライオ EM 構造が米国のグループから報告されましたが, われわれは, ミトコンドリア上には SAM<sup>core</sup> 複合体だけでなく SAM<sup>dimer</sup> 複合体が存在することを生化学的実験から証明しました。

外膜のタンパク質搬入口 TOM 複合体の孔をつくる Tom40 (これも  $\beta$ -バレル型膜タンパク質) が SAM 複合体によってバレル型構造をつくって外膜に組み込まれるためには, Sam50, Sam35, Sam37 以外にやはり  $\beta$ -バレル型膜タンパク質の Mdm10 を必要とすることが分かっていますが, 具体的なメカニズムは不明でした。そこで酵母細胞から Mdm10 を含む SAM 複合体を精製し, やはり東京大学のクライオ電子顕微鏡を用いてその構造を 2.8-3.2 Å の分解能で決定しました (SAM<sup>Mdm10</sup> 複合体, 図 3)。SAM<sup>Mdm10</sup> 複合体は Sam50, Mdm10, Sam35, Sam37 が各々 1 分子ずつから構成され, SAM<sup>dimer</sup> 複合体の Sam50b の位置に Mdm10 がバレル型の構造をつくって結合していました。しかし Mdm10 は SAM<sup>dimer</sup> 複合体の Sam50b と異なり, バレル型構造がきれいに閉じた形 (クローズ型) になっていました。

生化学的実験から, 基質の  $\beta$ -バレル型膜タンパク質の  $\beta$ -ストランドが 1 本ならば, SAM 複合体上に Sam50a, Sam50b, バレル型構造を形成する途上の基質の  $\beta$ -バレル型膜タンパク質が共存できますが, 基質が  $\beta$ -ストランド 7 本以上シートをつくると, SAM 複合体上に基質タンパク質と Sam50b は共存できないことがわかりました。また基質の  $\beta$ -バレル型膜タンパク質が SAM 複合体に結合しているときは, Mdm10 は SAM 複合体に結合できないことがわかりました。

以上, 今回明らかになった SAM<sup>dimer</sup> 複合体, SAM<sup>Mdm10</sup> 複合体の構造から,  $\beta$ -バレル型膜タンパク質がバレル型構造をつくって膜に組み込まれるプロセスについて, 図 4 のようなモデルを提案しました。SAM 複合体は Sam50 が 1 分子の SAM<sup>core</sup> 複合体と 2 分子の SAM<sup>dimer</sup> 複合体の平衡にあります。ここに Tom40 のような基質となる  $\beta$ -バレル型膜タンパク質が膜間部側から来ると, Sam50b が SAM 複合体からはずれ, Sam50b の位置に基質が入ります。そこで基質は  $\beta$ -ストランドを 1 本ずつ折りたたみ, バレル型のシートをつくっていきます。バレル型構造が完成すると Tom40 の位置にバレル型の Mdm10 が入り込むことで, Tom40 のバレル型構造を SAM 複合体から追い出します。こうしてできた SAM<sup>Mdm10</sup> 複合体は Mdm10 と Sam50b が入れ替わることで, 再び SAM<sup>dimer</sup> 複合体となって反応サイクルの最初の状態に戻ります。一方バレル型構造が完成して外膜に組み込まれた Tom40 は他のサブユニットとともに TOM 複合体を形成することになります。このように SAM 複合体は Sam50a, Sam35, Sam37 がコアとなる構造をつくり, Sam50b の位置に基質の  $\beta$ -バレル型膜タンパク質, Mdm10 が入れ替わりに入ることで, 基質がバレル型の構造をつくることを促すこと, Sam50b の位置がバレル型構造をつくる鋳型として働くことがはじめて明らかになりました。

## ■今後の展開

本研究で SAM 複合体に基質が結合する前 (SAM<sup>dimer</sup> 複合体) と後 (SAM<sup>Mdm10</sup> 複合体) の SAM 複合体の二つの精密構造が明らかになり,  $\beta$ -バレル型膜タンパク質が SAM 複合体により, バレル型構造をつくって膜に組み込まれるプロセスの鍵となる部分, Sam50b, 基質, Mdm10 が相互に入れ替わることがわかりました。実際に SAM 複合体に基質の  $\beta$ -バレル型膜タンパク質が結合して, バレル型構造をつくる詳細なプロセスについては, 今後の課題となります。本研究で解析した酵母 SAM 複合体は, ヒト細胞でも同じメカニズムで  $\beta$ -バレル型膜タンパク質の組み込み装置として働くと考えられています (ただしヒトでは Sam50 は保存されていますが, Sam35 と Sam37 は別のサブユニットに置き換わっています)。したがって SAM 複合体の機能欠損を解析することにより, 今後ミトコンドリアへの物質の取り込みや送り出しに関わる孔をつくる  $\beta$ -バレル型膜タンパク質と病気の関係などが明らかになっていくことが考えられます。将来的には, ミトコンドリア外膜の孔をつくるプロセスの効率の制御

により、ミトコンドリア機能や細胞機能を制御することで、未開発だったミトコンドリアの欠損に伴う病態の治療法開発に道筋をつけることや老化の予防につながることも期待されます。

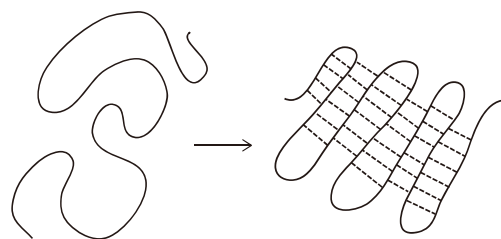
## ■用語・事項の解説

### 1 ミトコンドリア

酵母からヒトまで広く真核生物の細胞内に見られる必須の細胞内小器官。生命活動に必要なエネルギー（ATP）を酸素呼吸によって産生するほか、さまざまな物質の代謝やアポトーシス（細胞死）にも関わる。ミトコンドリアの機能低下や機能異常と、老化やがん、糖尿病、さまざまなミトコンドリア病との関連が分かっている。ミトコンドリアの機能を健全に保つことがヒトの健康に重要であることから、異常ミトコンドリアを除去する方法や健全なミトコンドリアを増やす方法の開発が注目されている。

### 2 $\beta$ -バレル型膜タンパク質

タンパク質のポリペプチド鎖が折り返して順次逆平行に並んでいくことで作られる $\beta$ -シートという二次構造をつくることのできる。この $\beta$ -シートが円筒形（バレル型）に丸まって作られるタンパク質を $\beta$ -バレルタンパク質という。このときバレル型構造の外側が疎水性、内側が親水性になることで、生体膜に埋め込まれるタイプの膜タンパク質を $\beta$ -バレル型膜タンパク質という。ほとんどの膜タンパク質はらせん状の二次構造である疎水性 $\alpha$ -ヘリックスから組み立てられているので、 $\beta$ -バレル型膜タンパク質は例外的な膜タンパク質ということになる。細菌の外膜には様々な $\beta$ -バレル型膜タンパク質が存在し、細胞外からの物質の取り込みなどの役割を担っている。真核生物では細菌に起源をもつミトコンドリアと葉緑体の外膜に $\beta$ -バレル型膜タンパク質が存在し、やはりミトコンドリアや葉緑体の内外の物質の出入りを担っている。



$\beta$ -シートの形成。破線は水素結合

### 3 SAM 複合体

ミトコンドリアの外膜に $\beta$ -バレル型膜タンパク質を組み込む装置として働く膜タンパク質複合体。酵母では $\beta$ -バレル膜タンパク質の Sam50 と Sam35, Sam37 から構成されるが、ヒトなど哺乳動物のミトコンドリアでは Sam50 とメタキシンから構成される。細菌の外膜で $\beta$ -バレル型膜タンパク質を組み込む装置は BAM 複合体であり、その中心サブユニットの BamA ( $\beta$ -バレル型膜タンパク質) と Sam50 は進化的に類似しているが、他のサブユニットは異なる。

### 4 クライオ電子顕微鏡による単粒子解析法

生体試料を液体窒素 (-196°C) 冷却下で急速凍結して電子線を照射し、生体分子を染色することなく電子顕微鏡で観察する（クライオ電子顕微鏡法）。これまでの精密構造決定の主役であった X 線構造解析には試料の結晶化が必須だったが、良質のデータの高感度取得法および大量の画像データから三次元構造を再構成する手法（単粒子解析法）の開発により、結晶化しない生体試料でも解像度 3 Å 程度の構造を決定することができるようになった。この方法の進展により、これまで結晶化が困難であったタンパク質の巨大複合体や膜タンパク質の構造解析が急速に進むようになった。2017年に、その開発に貢献した研究者 3 名がノーベル化学賞を受賞している。

■論文情報

論文タイトル	Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by $\beta$ -barrel switching (ミトコンドリアのSAM複合体は $\beta$ バレルタンパク質の交換を介して機能する)
掲載誌	英国科学誌「Nature」(オンライン版)
掲載日	2021年1月7日(木)(日本時間)
著者	竹田弘法 <sup>1</sup> , 鈴木純子, 遠藤斗志也 <sup>2</sup> (京都産業大学) 包明久, 吉川雅英, 西澤知宏, 濡木 理(東京大学) 今井賢一郎, 山守 優, 富井健太郎(産業技術総合研究所) 小笠原 諭, 村田武士(千葉大学) Caroline Lindau, Jon V. Busto, Lena-Sophie Wenz, Lars Ellenrieder, Sebastian P. Straub, Waltraut Mossmann, Jian Qiu, Thomas Becker, Nils Wiedemann, Nikolaus Pfanner (ドイツ・フライブルグ大学) (1筆頭著者, 2責任著者)(研究当時)
DOI	doi: 10.1038/s41586-020-03113-7

【研究に関する問い合わせ】

京都産業大学 生命科学部教授(タンパク質動態研究所所長) 遠藤斗志也(えんどうとしや)  
TEL : 075-705-1508 Email : tendo@cc.kyoto-su.ac.jp

【報道に関する問い合わせ】

京都産業大学 広報部  
TEL : 075-705-1411 FAX : 075-705-1987 E-mail : kouhou-bu@star.kyoto-su.ac.jp

【配信先】

京都大学記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブ、在阪民放四社京都支局連絡協議会、文部科学記者会、科学記者会

■ 添付資料

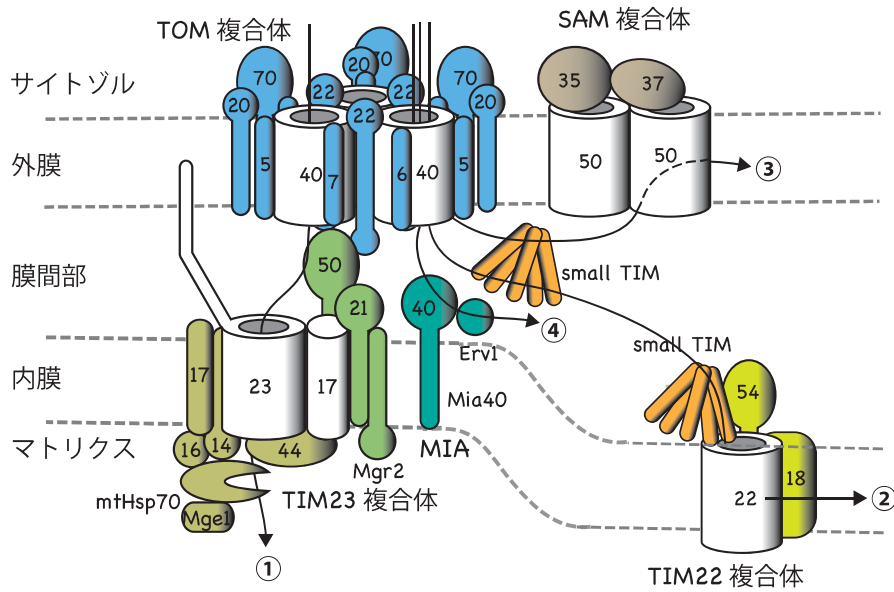


図 1: ミトコンドリアへのタンパク質配送経路と SAM 複合体

1000 種類以上のタンパク質のミトコンドリアへの配送経路 (黒矢印)。サイトゾルで合成されたβ-バレル型膜タンパク質は搬入口の TOM 複合体を通して外膜を通過し、膜間部から SAM 複合体により外膜にβ-バレル型構造を作りながら組み込まれる (図中の経路③)。

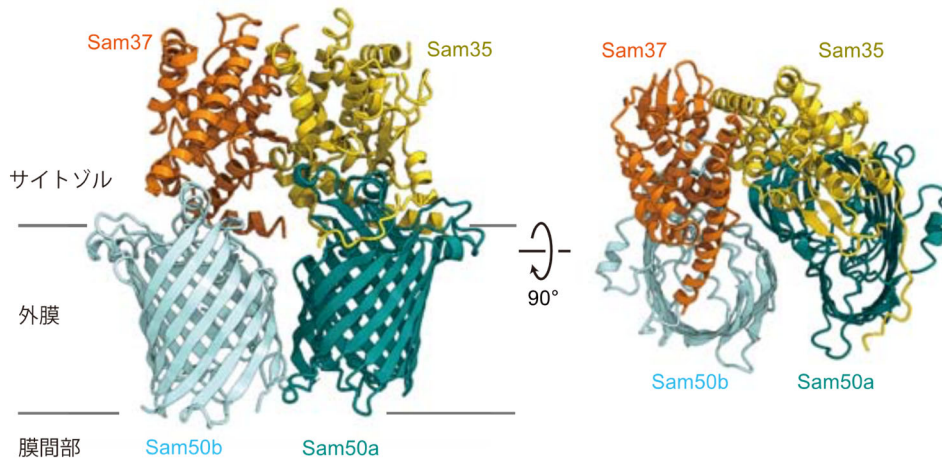


図 2: クライオ電子顕微鏡を用いて決定された SAM<sup>dimer</sup> 複合体の構造

SAM<sup>dimer</sup> 複合体は Sam50 が 2 分子, Sam35 と Sam37 が各々 1 分子ずつから構成される。左は膜面の横から見た構造, 右はサイトゾル側から見た構造。



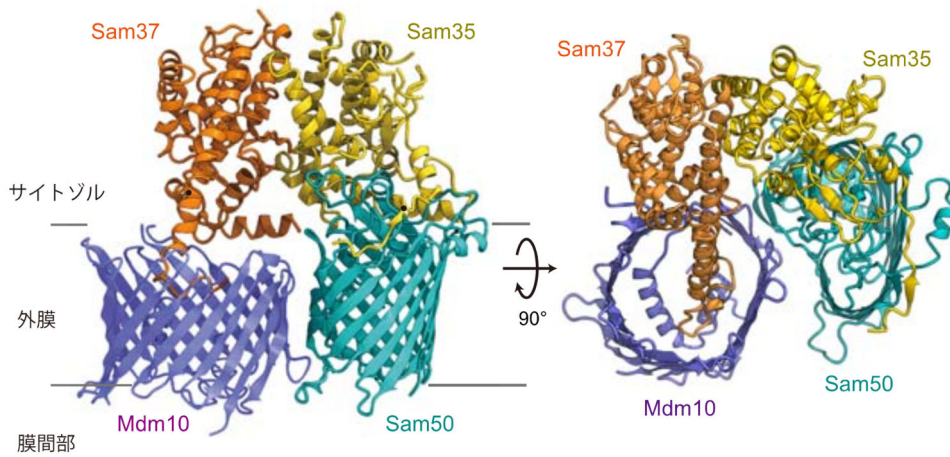


図 3: クライオ電子顕微鏡を用いて決定された SAM<sup>Mdm10</sup> 複合体の構造

SAM<sup>dimer</sup> 複合体は Sam50, Sam35, Sam37, Mdm10 が各々1分子ずつから構成される。左は膜面の横から見た構造, 右はサイトゾル側から見た構造。

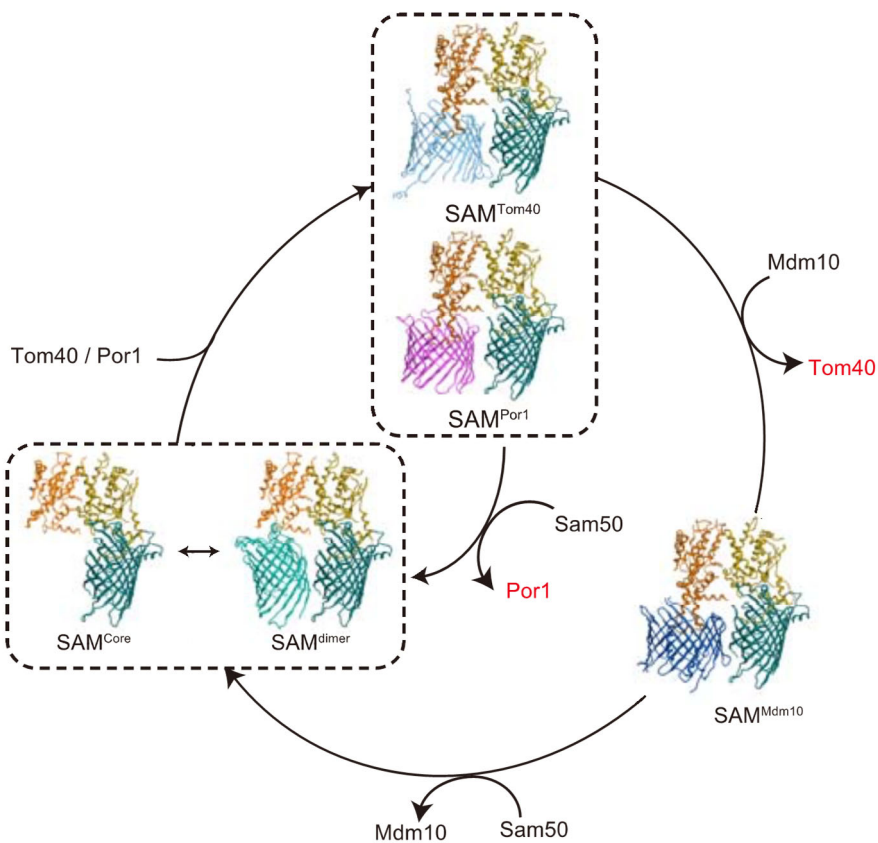


図 4: SAM 複合体によるβ-バレル型膜タンパク質の外膜への組み込み反応サイクル

SAM<sup>dimer</sup> 複合体の Sam50b と基質のβ-バレル型膜タンパク (Tom40, Por1 など) とが入れ替わる。基質はβ-バレル型構造を形成しながら外膜に組み込まれる。SAM 複合体のもう一つのサブユニット Mdm10 (β-バレル型膜タンパク) が Tom40 と入れ替わり、バレル型構造を作った Tom40 を SAM 複合体から追い出す。Mdm10 と Sam50b が入れ替わって最初の状態に戻る。

以上