

提出日：平成 30 年 5 月 18 日

平成 29 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## (2) 研究成果の概要

課題名	ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体の立体構造解析	
研究代表者	氏名	荒磯 裕平
	所属機関名・部局名	京都産業大学 タンパク質動態研究所
	職名	研究員
事業名 (該当の事業名の右欄に○)		共同研究員
		超高磁場NMR 共同利用研究課題
	○	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題
		客員フェロー
蛋白研受入担当教員名		
<p>ミトコンドリア外膜のタンパク質膜透過装置（トランスロケータ）である TOM 複合体は、<math>\beta</math> バレル型チャンネルタンパク質 Tom40 と他の 6 つのサブユニットで構成される膜タンパク質複合体である。TOM 複合体は 3 つのチャンネルを持つ 3 量体として機能し、多様なミトコンドリアタンパク質がチャンネル内部に備わる複数の通り道を使って輸送されることが明らかになった。しかし、構造生物学的な知見はいまだ乏しく、チャンネル内部における基質タンパク質の輸送メカニズムを原子分解能レベルで議論するには至っていない。そこで本研究課題では、クライオ電子顕微鏡単粒子解析によって 3 量体機能型 TOM 複合体の高分解能構造を決定することでミトコンドリアタンパク質の膜透過機構を解明することを目的とした。Tom22 サブユニットの C 末端にヒスチジンタグを導入した酵母株より界面活性剤ジギトニン存在下でアフィニティ精製した TOM 複合体は、ネガティブ染色において 3 つの孔を有する均一な 3 量体構造が観察され、さらに界面活性剤を LMNG へ置換した試料においては高コントラストの 2 量体構造が見出されたが、クライオ電子顕微鏡を用いた予備的な観察では複合体の変性凝集や解離によって構造解析を進めることはできなかった。現在は、界面活性剤のスクリーニングや GraDeR 法によるフリーミセルの除去、両親媒性ポリマー Amphipol への置換、GraFix 法による架橋等を行うことで試料条件の最適化を進めている。GraFix 法では、3 量体構造を保ったまま、複合体間で凝集することなく構成サブユニット同士が架橋される条件を見出し、クライオ電子顕微鏡観察において分散性の高い粒子を観察することに成功したが、2D classification において解釈可能な 3 量体構造を得ることはできず、測定条件の更なる最適化が必要である。今後は、酵母 TOM 複合体のナノディスクへの再構成を試みるとともに、他の生物種由来の TOM 複合体をスクリーニングすることで、より安定性の高い構造解析に適した試料を探索する。均一な TOM 複合体粒子が観察される条件が決定されれば、電子直接検出カメラと Volta phase plate を備えた TitanKRIOS (FEI) によってデータセットを収集し、3 量体 TOM 複合体の高分解能での構造決定を目指す。</p>		

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 30 年 5 月 18 日（金） ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp