

提出日：平成 29 年 5 月 19 日

平成 28 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ー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・総合生命科学部	
	職名	特別研究員	
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>TOM 複合体は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、サイトゾルで合成された前駆体ミトコンドリアタンパク質のほとんどは TOM 複合体のチャンネルの内側を通過してミトコンドリアに取り込まれる。TOM 複合体は 8 バレル型膜タンパク質 Tom40 と 1 回膜貫通ヘリックスを有する 6 つのサブユニットで構成され、3 分子の Tom40 チャンネルを含む三量体複合体として機能するが、膜透過チャンネルを含む全体構造の精密構造解析が達成されていないため詳細な輸送機構を議論することができない。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 TOM 複合体の高分解能立体構造を決定し、TOM 複合体によるミトコンドリアタンパク質輸送メカニズムを近原子分解能レベルで解明することを目的とする。そのために、我々は出芽酵母から単離したミトコンドリア画分を界面活性剤ジギトニンで可溶化し、分子量約 450kDa の均一な TOM 複合体を精製する実験系を確立した。さらに精製 TOM 複合体のジギトニンミセルを Amphipol へ置換し、TOM 複合体粒子が観察される試料凍結条件を検討した。TOM 複合体粒子が観察された条件について、大阪大学蛋白質研究所の所有する TitanKRIOS (FEI) にて、電子直接検出カメラ Falcon II と Volta phase plate を用いて約 400 枚のデータセットを収集したが、粒子のコントラストが弱く形状も不均一であったため、解釈可能な 2D classification を行うことができなかった。今後は、Amphipol 置換条件のさらなる最適化やナノディスクへの再構成法を確立することで試料の安定化を目指す。また、出芽酵母の発現系を用いて、膜透過反応が停止したリボソーム・ミトコンドリアタンパク質・TOM 複合体からなる膜透過中間体の精製にも成功し、TOM 複合体単独と同様にしてクライオ電子顕微鏡単粒子解析を試みた。約 1800 枚のデータセットを収集し 2D classification を行ったところ、リボソームに特徴的な高次構造が見出され、さらに 3D reconstruction によって 17.2 Å 分解能で density map が得られた。しかし、TOM 複合体部分の局所分解能が著しく低く構造決定には至っていない。今後は測定条件のさらなる最適化や、TOM 複合体部分の focused refinement によって、TOM 複合体の高分解能構造決定を目指す。</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 29 年 5 月 19 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