

学 位 論 文
Doctoral Thesis

ミトコンドリア内膜 AAA シャペロン Bcs1 の機能解析
(**Functional analysis of Bcs1, a AAA chaperone
in the mitochondrial inner membrane**)

澤村 理英
Rie Sawamura

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子細胞制御学

指導教員

小椋 光 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子細胞制御学

2014年3月

学 位 論 文
Doctoral Thesis

論文題名： ミトコンドリア内膜 AAA シャペロン Bcs1 の機能解析
(Functional analysis of Bcs1, a AAA chaperone in the mitochondrial inner membrane)

著 者 名： 澤村 理英
Rie Sawamura

指導教員名：熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子細胞制御学
小椋 光 教授

審査委員名： 分子病理学担当教授 山本 哲郎
細胞医学担当教授 中尾 光善
分子遺伝学担当准教授 寺田 和豊

2014年3月

目次	
1) 要旨	3
2) 本博士論文に関する発表論文	4
3) 謝辞	5
4) 略語一覧	6
5) 研究の背景と目的	
5)-1 AAA タンパク質	7
5)-2 AAA タンパク質を起因とする疾患	9
5)-3 呼吸鎖複合体Ⅲと分子シャペロン	11
5)-4 Bcs1 の分子機能	13
5)-5 Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合経路	16
5)-6 <i>bcs1</i> 欠失株における Rip1 量の減少とプロテアーゼの関係性	18
5)-7 本研究の目的	19
6) 実験方法	
6)-1 株と培養条件	
6)-1-1 大腸菌	20
6)-1-2 酵母	20
6)-2 プラスミド	23
6)-3 呼吸活性実験	27
6)-4 ミトコンドリアの単離	27
6)-5 Rip1 タンパク質の精製と抗体作製	29
6)-6 Western blotting	30
6)-7 Blue Native-PAGE	30
6)-8 Proteinase K 消化実験	31
6)-9 化学架橋実験	31
6)-10 超遠心による不溶性タンパク質・可溶性タンパク質の分離	31
6)-11 RT-PCR	32
6)-12 膜電位測定	32
6)-13 化学架橋産物の精製と同定	33
7) 実験結果	
7)-1 Bcs1 の機能に必要な領域の探索と各複合体形成の検討	34
7)-2 抗 Rip1 抗体の作製と特異性の確認	42
7)-3 N 末端変異株における各複合体形成の検討	43
7)-4 N 末端変異株における Rip1 のミトコンドリア内局在の検討	45
7)-5 N 末端領域における相互作用因子と変異による影響の検討	47

7)-6 相互作用因子同定の試み	48
7)-7 膜電位形成能と複合体形成への影響	51
7)-8 Rip1 のミトコンドリア内挙動の解析	
7)-8-1 Rip1 会合経路仮説	54
7)-8-2 各変異株における Rip1 検出量の比較	55
7)-8-3 Rip1 のミトコンドリア内局在の検討	57
7)-8-4 RT-PCR による Rip1 の mRNA 量の測定	59
8) 考察	
8)-1 Bcs1 の膜間部 N 末端領域の構造的特徴	60
8)-2 Bcs1 の膜間部 N 末端領域の役割	62
8)-3 Bcs1 複合体の構成	64
8)-4 ミトコンドリア内 Rip1 の成熟と局在	65
8)-5 Bcs1 の Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの組込みメカニズム仮説	66
8)-6 その他の Bcs1 の機能の可能性	67
9) 結語	68
10) 参考文献	69

1) 要旨

[目的] Bcs1 (ubiquinol-cytochrome c reductase (*b_c1*) synthesis) はミトコンドリア内膜に存在する膜一回貫通型の AAA タンパク質である。そのヒトホモログ BCS1L は、深刻な多臓器不全または毛髪異常や感音性難聴を引き起こすが、これらの疾患発症のメカニズムや BCS1L の分子機能等については不明な点が多い。一方、酵母 Bcs1 では比較的解析が進んでおり、呼吸鎖複合体Ⅲの会合、特に鉄硫黄タンパク質 (Rip1) の未成熟複合体Ⅲへの会合に関与していることが明らかとなっている。そこで本研究では、Bcs1 の分子機能の解明を目的に、酵母 Bcs1 を用いて解析を行った。

[方法] 様々な変異型 Bcs1 を発現する酵母株を作製し、Bcs1 のどの領域または残基が、機能に必須であるかを調べた。機能不全を示す変異株における複合体Ⅲ形成への影響や、未会合 Rip1 の蓄積・発現の制御機構、Bcs1 と相互作用因子との結合への影響を検討した。また、Bcs1 の他の機能についても検討するため、電子伝達系の他の複合体の機能、複合体形成への影響を検討した。

[結果] Bcs1 の大部分 (C 末端領域) はマトリクス側に存在し、Bcs1 の機能やミトコンドリアへの局在化に必須である。これに対し、膜間部側に突出している N 末端領域の役割は不明であった。この N 末端領域の欠失 Bcs1 変異株を作製したところ、N 末端 44 残基のうち 38 番目の残基以降及び 38-40 番目の残基が必須であり、特に 38 番目の残基がある程度の疎水性を持つことが Bcs1 の機能に必要であると分かった。二次構造予測により、38 番目の残基を含む領域は α -helix 構造を形成しており、この構造を破壊すると Bcs1 は機能不全を示した。また、機能不全を示す N 末端変異型 Bcs1 は野生型と比較して、相互作用タンパク質との相互作用様式が異なることが分かった。また、Bcs1 は複合体Ⅴの機能に関わる可能性が示唆された。

[考察] Bcs1 の膜間部領域は、Rip1 のマトリクス側から内膜の未成熟複合体Ⅲへの会合に関わると考えられ、内膜を隔ててどのように関わるのか興味深い。また、Bcs1 の N 末端変異により相互作用因子との結合が変化することから、この相互作用因子を同定することで Bcs1 の作用メカニズムが明らかになると期待される。

[結論] これまで機能的な重要性が不明であった Bcs1 の N 末端膜間部領域が機能に必須であり、特に α -helix 構造を持つことが重要であることを明らかにした。この N 末端領域は Rip1 のマトリクスから内膜の未成熟複合体Ⅲへの会合に重要であり、相互作用因子との結合に関与していることが分かった。

2) 本博士論文に関する発表論文

Rie Sawamura, Teru Ogura and Masatoshi Esaki (2014) A conserved α helix of Bcs1, a mitochondrial AAA chaperone, is required for the Respiratory Complex III maturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 443: 997–1002

3) 謝辞

本研究は、熊本大学発生医学研究所発生制御部門分子細胞制御分野において、小椋光教授、山中邦俊准教授、江崎雅俊助教の指導のもとに行われました。

小椋光教授には、研究支援及び研究費を獲得するために必要な書面の作成をはじめとして、研究生活に関する相談まで幅広くご指導、ご鞭撻をいただきました。山中邦俊准教授には、研究に対しての姿勢や知識の広げ方等学習面で多くご指導をいただき、様々な場面でご助力をいただきました。江崎雅俊助教には、実地での実験に関する適切な技術や知識、結果から得られる考察の方法をはじめとして、本博士論文及びこれに関する発表論文作成の際には多大なるご指導をいただき、学習面に関しても英語のレッスンを行う等、実験外でもご支援をいただきました。また、同分野から他分野に渡り多くの研究者の方々とのお会いする機会も設けてくださいました、教官の皆様に深く感謝し、厚くお礼申し上げます。

そして、研究生活内外で多くのご指導、ご協力をいただきました、本研究室の諸先輩、後輩方、そして、実験に集中できる最適な実験環境を提供し続けて下さったスタッフの方々に感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、著者はグローバル COE プログラム「細胞系譜制御研究の国際的人材育成ユニット」、組織的な大学院教育改革推進プログラム「臨床・基礎・社会医学一体型先端教育の実践」によりリサーチアソシエイトとして雇用され、支援を受けました。また、平成 24 年度から日本学術振興会の特別研究員 (DC2) に採用され、特別研究員奨励費を獲得しました。この奨励費獲得により、平成 25 年度には海外学会に参加することができ、良い経験を得るとともにより充実した研究生活を過ごすことができました。また、雇用支援だけでなく、グローバル COE プログラムによるリエゾンラボ研究会では、毎週様々な分野の研究者講演を受講することができ、本研究を続けるモチベーションアップにつなげることができました。技術的支援として、発生医学研究と遺伝子実験施設の共通機器、シーケンス支援及び質量分析支援を活用することで、有意義な実験結果を得ることができました。このような様々な支援のもとに、本研究を成すことができました。技官の方々をはじめとして、ご協力いただいた関係者の方々に深くお礼申し上げます。

最後に、本研究に日々集中し、研究を継続したことで本博士論文を作成するに至りましたのは、ひとえに父母をはじめとした家族の支えによるものであり、ここに深く感謝いたします。

4) 略語一覧

AAA: ATPase associated with diverse cellular activities

Amp: Ampicillin

ATP: Adenosine Triphosphate

BPB: Bromophenol blue

BSA: Bovine serum albumin

CBB: Coomassie brilliant blue

DTSSP: 3, 3'-Dithiobis [sulfosuccinimidylpropionate]

DTT: Dithiothreitol

EDTA: Ethylenediamine -N, N, N', N' -tetraacetic acid

FADH₂: Flavin adenine dinucleotide, reduced

2-ME: 2-Mercaptoethanol

NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride

PCR: Polymerase chain reaction

PVDF: Polyvinylidene difluoride

RT-PCR: Reverse transcription Polymerase chain reaction

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TBS-T: Tris buffered saline with tween 20

アミノ酸一文字表記

A = アラニン

E = グルタミン酸

Q = グルタミン

D = アスパラギン酸

N = アスパラギン

L = ロイシン

G = グリシン

K = リシン

S = セリン

V = バリン

R = アルギニン

T = トレオニン

P = プロリン

I = イソロイシン

M = メチオニン

F = フェニルアラニン

Y = チロシン

C = システイン

W = トリプトファン

H = ヒスチジン

5) 研究の背景と目的

5)-1 AAA タンパク質

本研究のテーマである Bcs1 タンパク質は、一次構造の特徴から AAA (ATPase associated with diverse cellular activities) タンパク質ファミリーに属する。図 1 に細胞内の様々な AAA タンパク質を示す。AAA タンパク質は、よく保存された約 240 アミノ酸残基で構成され、AAA ドメインと呼ばれる ATPase ドメインを共通に保持し、基質タンパク質とその複合体の立体構造をエネルギー依存的に変換する分子シャペロンである (Ogura and Wilkinson, 2001)。AAA タンパク質は、真正細菌 (原核生物) からヒトに至るまで普遍的に存在し、真核生物ではほぼ一定の数 (20 数個) が存在する (図 1) (Ogura and Wilkinson, 2001)。それぞれの AAA タンパク質は様々な細胞機能に関与しており、大きく分けて 6 つのサブグループに分類される。(1) 26S プロテアソームのサブユニット、(2) NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) 等のタンパク質輸送における膜融合過程に働く因子、(3) p97 等の小胞体とゴルジ体の再構成に関わる因子、(4) Pex1 や Pex6 等のペルオキシソーム形成因子、(5) spastin 等の細胞分裂に関連する因子、(6) FtsH 等のメタロプロテアーゼである (Ogura and Wilkinson, 2001)。この多様性に富んだ機能が、AAA タンパク質と命名された所以となっている。

AAA タンパク質ファミリーは、AAA ドメイン以外の構造配列により機能の多様性を広げている一方で、共通してタンパク質またはその複合体のアンフォールディングや脱会合、脱凝集に関与している (Ogura and Wilkinson, 2001)。

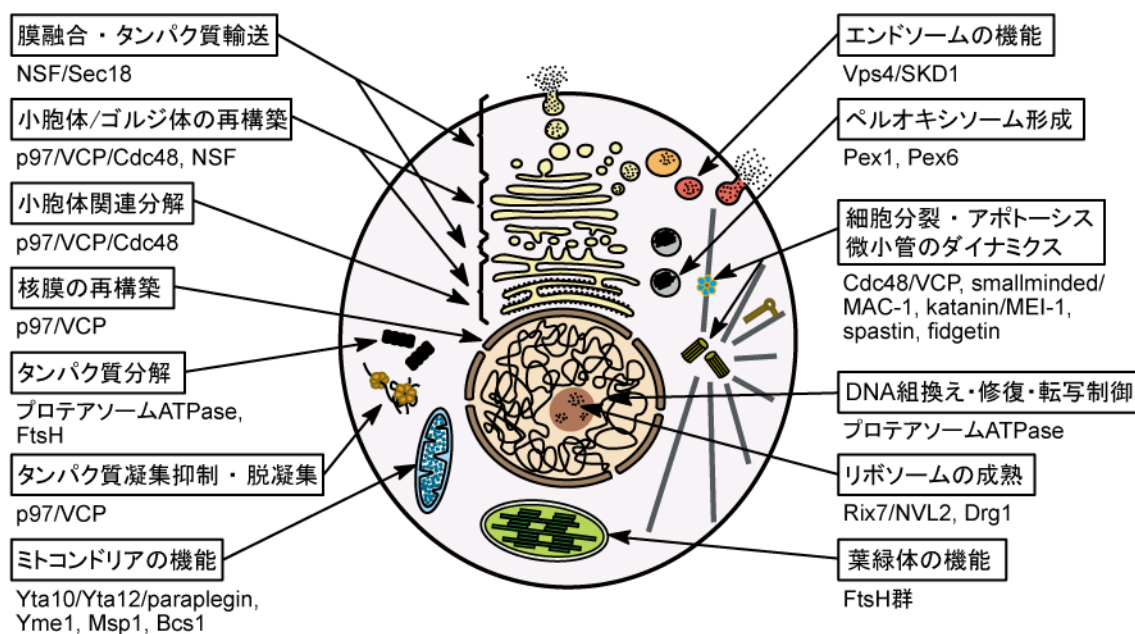


図 1 細胞内の様々な AAA タンパク質

AAA ドメインは、John E. Walker らにより提唱された Walker 型 ATPase を含んでおり (Walker *et al.*, 1982), 多くのヌクレオチド結合タンパク質によく保存された二つのモチーフ、すなわち Walker A モチーフ: GxxxxGKT/S (x: 任意のアミノ酸) と Walker B モチーフ: hhhhDE (h: 疎水性アミノ酸) から構成されている (Ogura and Wilkinson, 2001)。Walker A モチーフは ATP の二つのリン酸基と相互作用し、ATP を補足する働きを持つものに対して、Walker B モチーフのアスパラギン酸残基は ATP の β と γ 位のリン酸基に配位する Mg^{2+} と相互作用し、グルタミン酸残基は ATP の加水分解に働く水分子を活性化化する (Ogura and Wilkinson, 2001)。つまり、Walker A モチーフは ATP の結合、Walker B モチーフは ATP の加水分解に必要である (Ogura and Wilkinson, 2001)。AAA ファミリータンパク質が、他の Walker 型タンパク質と区別される特徴として、前述した Walker A モチーフと Walker B モチーフの他に、約 20 アミノ酸残基からなる保存された SRH (second region of homology) 配列を持っている点にある (Lupas and Martin, 2002)。特に SRH 配列内の保存されたアルギニン残基は、ATPase 活性に必須であるといわれている (Karata *et al.*, 1999)。つまり、AAA タンパク質ファミリーはアミノ酸配列の相同性に基づいて定義される。

一般的な AAA タンパク質は六量体であり、リング構造を形成して機能している。中央には孔 (pore) が存在し、基質タンパク質への作用機構として、この孔を利用した「糸通しモデル」が提唱されている (図 2) (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。リングの孔に面して pore ループと呼ばれる構造があり、ここに保存された芳香族アミノ酸残基は機能に必須である。「糸通しモデル」は、この必須芳香族アミノ酸と基質タンパク質が結合し、ATP 加水分解で生じたエネルギーを利用して、この芳香族アミノ酸を含む pore ループが構造変化することで、基質タンパク質を孔に通してアンフォールディングさせることを提唱している (錦織・小椋, 2006)。この時、基質は N 末端側から AAA ドメイン側に輸送される。この pore ループは「@xG (@: 芳香族アミノ酸, x: 任意のアミノ酸)」という特徴的配列をしており、多くの AAA タンパク質の場合、Walker A モチーフと Walker B モチーフの間に保存されている。しかし、本研究のテーマである Bcs1 には、Walker A モチーフと Walker B モチーフの間に pore ループの配列が含まれない (図 7 参照)。このことから、Bcs1 は他の AAA タンパク質とは異なる作用機構で機能している可能性が考えられる。

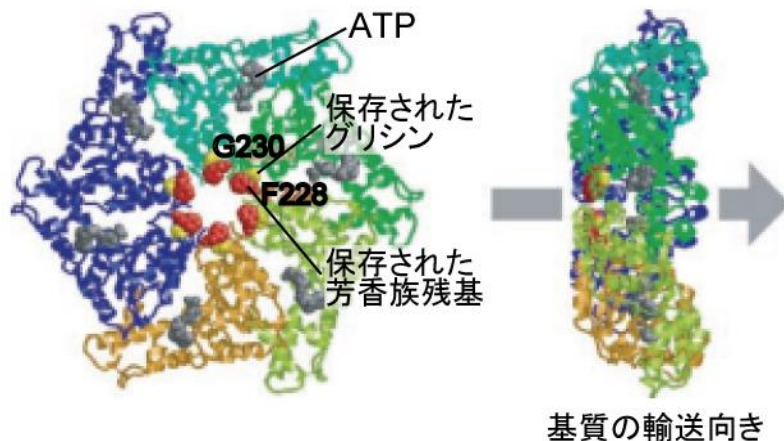


図 2 pore ループに保存された残基と「糸通しモデル」(Yamada-Inagawa *et al.*, 2003 改変)

5)-2 AAA タンパク質を起因とする疾患

近年, AAA タンパク質に起因するヒト疾患・実験動物の発生異常が報告されており, AAA タンパク質は医学的にも注目されているファミリータンパク質である (表 1)。

本研究のテーマであるミトコンドリア内膜 AAA タンパク質 Bcs1 のヒトホモログ BCS1L の変異で発症する疾患として, 複合体Ⅲ欠損症 (de Lonlay *et al.*, 2001), GRACILE 症候群 (Visapää *et al.*, 2002) 及び Björnstad 症候群 (Hinson *et al.*, 2007) が報告されている。複合体Ⅲ欠損症は, 出生時の代謝性アシドーシス, 新生児細尿管症, 肝性細胞溶解や肝不全のいずれかと一致する肝性合併症を示し, また, すべての場合において神経性の合併症を発症することが報告されている (de Lonlay *et al.*, 2001)。GRACILE 症候群は, Growth Retardation (成長遅延), Aminoaciduria (アミノ酸尿), Cholestasis (胆汁うっ滞), Iron overload (鉄過負荷), Lactacidosis (乳酸アシドーシス), そして Early death (早期死亡) と臨床症状の頭文字がその名前の由来である (Visapää *et al.*, 2002)。Björnstad 症候群は難聴, 捻転毛が主な症状として現れる疾患であり, 1998 年に遺伝子座 2q34-36 が原因であることが報告され (Lubianca Neto *et al.*, 1998), 2007 年に BCS1L に起因する疾患であることが同定された (Hinson *et al.*, 2007)。このように同じ BCS1L が原因であるにもかかわらず, 様々な重症度の異なる症状を示すことも BCS1L 疾患の特徴である。

他にもミトコンドリアに局在し, ヒト疾患に関わる AAA タンパク質が存在する。膜結合型 AAA メタロプロテアーゼである Paraplegin の変異は, ミトコンドリアの呼吸不全により遺伝性痙性対麻痺 (Hereditary spastic paraplegia) を発症する (Casari *et al.*, 1998)。また, Paraplegin と複合体を形成する AFG3L2 の変異は, 神経細胞であるプルキンエ細胞の変性により生じる脊髄小脳失調症 28 型を発症する (Maltecca *et al.*, 2009)。

ミトコンドリア以外では, ペルオキシソーム形成因子である Pex1 と Pex6 の変異は, ペルオキシソームの形成不全によりヒトでは Zellweger 症候群等の遺伝病を発症する

(藤木, 2004)。微小管切断活性を有する spastin の変異により, 遺伝性痙性対麻痺を発症する (Hazan *et al.*, 1999)。小胞体関連分解 (ERAD), 膜融合, アポトーシス及び転写調節等多くの機能を持つ p97/VCP の変異は, 骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う家族性封入体筋炎や筋委縮性側索硬化症を発症する (Watts *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2010)。また, fidgetin は, 実験マウスで内耳や眼の発達異常や行動異常を示す fidget (落着きのない) 変異マウスの原因因子として同定された (Cox *et al.*, 2000)。

表 1 ヒト疾患・実験動物の発生異常に関わる AAA タンパク質

AAA	由来	疾患	出典
BCS1L	ヒト	複合体III欠損症	de Lonlay <i>et al.</i> , 2001
BCS1L	ヒト	GRACILE 症候群	Visapää <i>et al.</i> , 2002
BCS1L	ヒト	Björnstad 症候群	Hinson <i>et al.</i> , 2007
paraplegin	ヒト	遺伝性痙性対麻痺 (劣性遺伝)	Casari <i>et al.</i> , 1998
spastin	ヒト	遺伝性痙性対麻痺 (優性遺伝)	Hazan <i>et al.</i> , 1999
AFG3L2	ヒト	脊髄小脳失調症 28 型 (SCA28)	Maltecca <i>et al.</i> , 2009
Pex1, Pex6	ヒト	ペルオキシソーム病	藤木, 2004
p97/VCP	ヒト	骨パジェット病と前頭側頭葉型認知症を伴う家族性封入体筋炎 (IBMPFD)	Watts <i>et al.</i> , 2004
p97/VCP	ヒト	筋委縮性側索硬化症 (ALS)	Johnson <i>et al.</i> , 2010
fidgetin	マウス	fidget 変異 (頭部, 特に内耳・眼の発達異常)	Cox <i>et al.</i> , 2000
p97/VCP	マウス	ポリグルタミン凝集体による神経細胞死	Yasuda <i>et al.</i> , 1999
p97/VCP	マウス	アポトーシス	Shirogane <i>et al.</i> , 1999
MAC-1	線虫	アポトーシス (CED-4 結合)	Wu <i>et al.</i> , 1999
ter94/VCP	ショウジョウバエ	ポリグルタミン凝集体による神経細胞死	Higashiyama <i>et al.</i> , 2002
NSF	ショウジョウバエ	comatose (昏睡)	Pallanck <i>et al.</i> , 1995
smid	ショウジョウバエ	Smallminded (中枢神経系の未発達, 細胞分裂異常)	Long <i>et al.</i> , 1998

5)-3 呼吸鎖複合体Ⅲと分子シャペロン

ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖電子伝達系は、細胞機能を維持するために必要な ATP を生み出すエネルギー変換膜である (図 3)。電子伝達系の呼吸鎖は主に 5 つの複合体から成り、NADH や FADH₂ から遊離した電子を次々と受け渡すことで膜間部にプロトンを汲み出し、マトリクスとの間にプロトン濃度勾配を発生させる。この電気化学的勾配の自由エネルギーを利用して、ADP から ATP が合成される。この過程において、複合体Ⅲは複合体ⅠもしくはⅡから補酵素 Q を介して伝達された電子を cytochrome c に受け渡す役割を担っており、このとき、ミトコンドリアマトリクスから膜間部へとプロトンを輸送する。

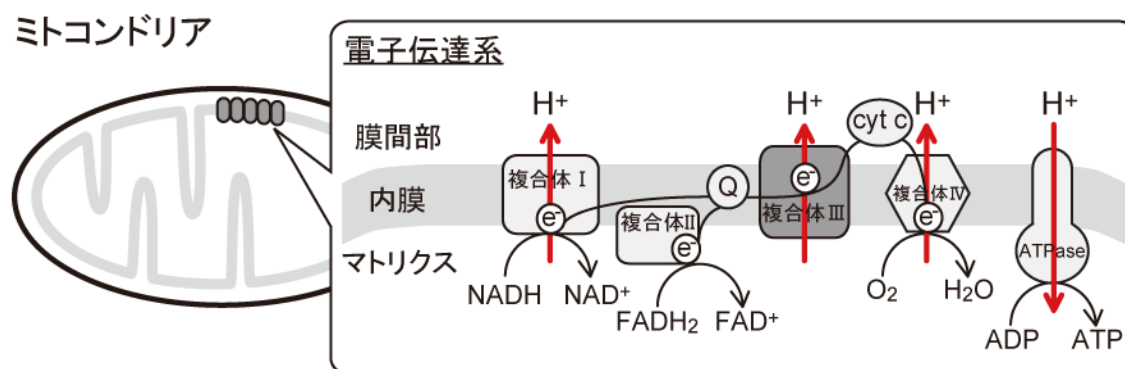


図 3 ミトコンドリアの電子伝達系呼吸鎖

複合体Ⅰ、複合体Ⅲ及び複合体Ⅳが、電子伝達駆動性プロトンポンプとしてマトリクスから膜間部へプロトンを汲み出す。このプロトン濃度勾配を利用して、ATP 合成酵素は ADP から ATP を産生する。Q: 補酵素, cyt c: cytochrome c

複合体Ⅲは、約 10 個のサブユニット (哺乳類では 11 個, 出芽酵母では 10 個) から構成される酵素複合体であり、最終的に二量体となり二つの複合体Ⅳと巨大複合体を形成している (Berry *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2004)。出芽酵母の複合体Ⅲを構成するサブユニットは、ミトコンドリア DNA にコードされた Cytochrome *b* (Cyt *b*), 核 DNA にコードされた core protein 1 (Core1), core protein 2 (Core2), Cytochrome *c*₁ (Cyt *c*₁), Rieske iron-sulfur protein (ISP, Rip1), Qcr6, Qcr7, Qcr8, Qcr9, Qcr10 である (Smith *et al.*, 2012)。これまでの報告で、複合体Ⅲ会合の過程が徐々に明らかになってきている (図 4) (Smith *et al.*, 2012)。複合体Ⅲ形成の流れを簡潔に記すと、まず、Cyt *b* が Qcr7 及び Qcr8 と複合体Ⅲ前駆体を形成する (図 4) (Smith *et al.*, 2012)。次に、Cyt *c*₁ と Core1, Core2, Qcr6 及び Qcr9 が次々と会合し、Rip1 が会合する前の未成熟複合体Ⅲが形成される (図 4) (Smith *et al.*, 2012)。最後に Rip1 と Qcr10 が会合し、成熟複合体Ⅲが形成される (図 4) (Smith *et al.*, 2012)。詳細は明らかになっていないが、いずれかのステップにおいて、

複合体Ⅲは二量体を形成する。これらの過程に関わるシャペロンとして、Bca1, TTC19, Mzm1 及び Bcs1 が報告されている (Cruciat *et al.*, 1999; Atkinson *et al.*, 2011; Ghezzi *et al.*, 2011; Mathieu *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2013)。Bca1 は、複合体Ⅲ前駆体の形成や安定性に関与しているといわれている (Mathieu *et al.*, 2011)。TTC19 は、複合体Ⅲ欠失を伴った脳症の原因因子として同定され、変異により Core1 や Core2 を含む中間体の蓄積が引き起こることから、複合体Ⅲ会合の初期の過程に関わることが示唆されている (Ghezzi *et al.*, 2011)。また、Mzm1 は、酵母で同定された因子であり、ミトコンドリアマトリクス内で Rip1 と相互作用し、Rip1 を凝集や分解から保護する作用があるとされており、近年、ヒトホモログも同定されている (Atkinson *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2013)。Bcs1 の詳細は後述する。このように、様々なタンパク質を介して複合体Ⅲが形成される。

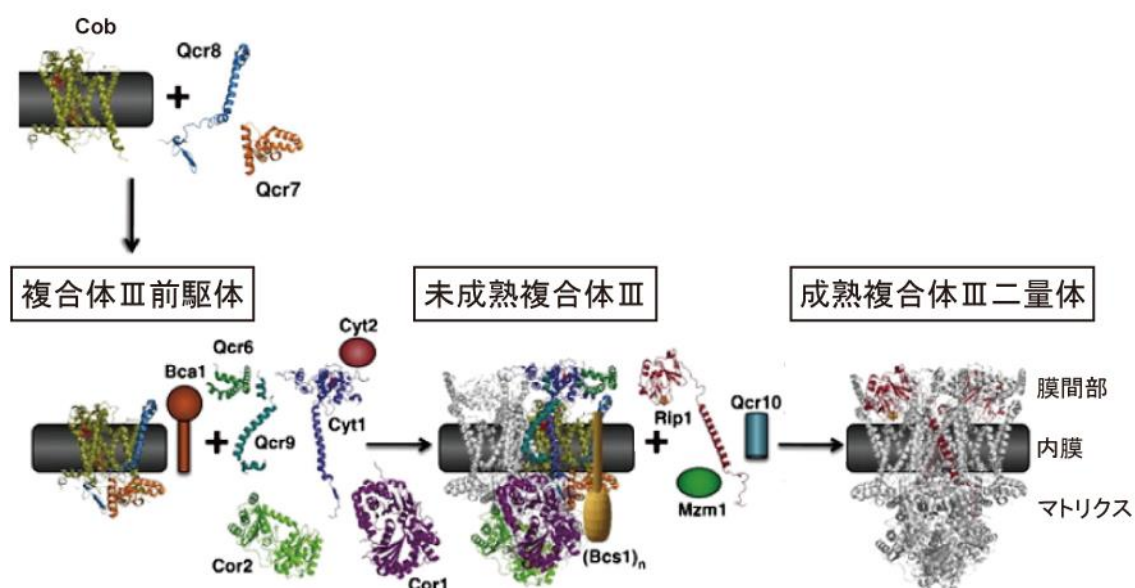


図4 呼吸鎖複合体Ⅲの会合スキーム (Smith *et al.*, 2012 改変)

複合体Ⅲ前駆体: Cyt *b*, Qcr7 及び Qcr8 の複合体

未成熟複合体Ⅲ: 複合体Ⅲ前駆体+Cyt *c*₁, Core1, Core2, Qcr6 及び Qcr9 の複合体

成熟複合体Ⅲ: 未成熟複合体Ⅲ+Rip1 と Qcr10 の複合体

Bca1: 複合体Ⅲ前駆体の形成や安定性に関与

Cyt2 (cytochrome *c*₁ heme lyase): Cyt *c*₁ の成熟に関与

Mzm1: Rip1 を凝集や分解から保護

Bcs1: Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合に関与

Cyt1: Cyt *c*₁, Cor1: Core1, Cor2: Core2

5)-4 Bcs1 の分子機能

Bcs1 (ubiquinol-cytochrome c reductase (*bcs1*) synthesis) は、約 20 年前に呼吸不全を示す酵母から発見された AAA タンパク質である (Nobrega *et al.*, 1992)。Bcs1 を欠失した場合、複合体Ⅲの構成因子のうち Rip1 と Qcr10 の会合不全が起こることから、Bcs1 は複合体Ⅲの会合に必須である (Cruciat *et al.*, 1999)。特に Rip1 のマトリクスから未成熟複合体Ⅲへの会合に必須であるが、その作用機構については不明な点が多い (図 5) (Conte *et al.*, 2011; Wagener *et al.*, 2011)。

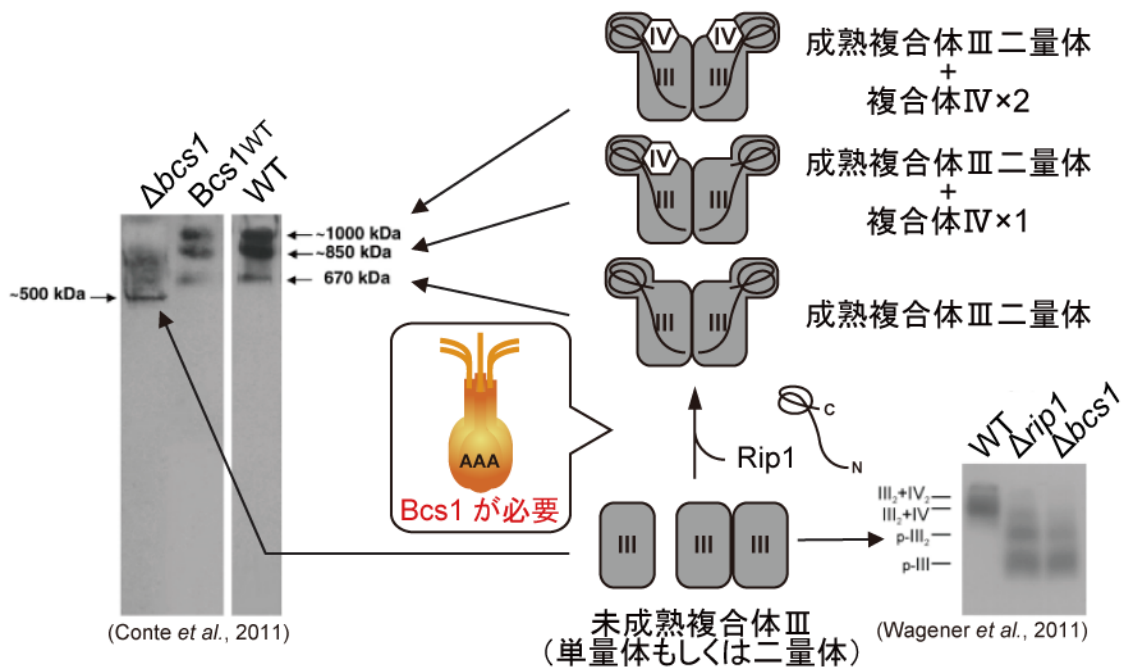


図 5 Bcs1 は Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合に関わる

単離ミトコンドリアを digitonin で可溶化し、Blue Native-PAGE を行い、抗 Cyt c_1 抗体で検出すると、野生株 (WT) と野生型 Bcs1 発現株 (Bcs1_{WT}) では「成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×2」, 「成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×1」及び「成熟複合体Ⅲ二量体」の各段階の複合体Ⅲが検出される (Conte *et al.*, 2011; Wagener *et al.*, 2011)。これに対し、*bcs1* 欠失株 ($\Delta bcs1$) では「未成熟複合体Ⅲ」が主に検出され (Conte *et al.*, 2011), 同時に「未成熟複合体Ⅲ二量体」が検出される場合もある (Wargener *et al.*, 2011)。また、Rip1 欠失株 ($\Delta rip1$) においても「未成熟複合体Ⅲ」が検出される (Wargener *et al.*, 2011)。すなわち、Bcs1 は Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合に必要である。

Bcs1 は、ミトコンドリア内膜に局在する一回膜貫通タンパク質であり、N 末端は膜間部に露出し、AAA ドメインを含むタンパク質の大部分はマトリクス側に局在している (図 6) (Fölsch *et al.*, 1996)。この AAA ドメインを含むマトリクス側領域は異なる生物種間でよく保存されており (図 7)、Bcs1 の機能である Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合にも、AAA ドメインの ATPase 活性が必須であることが報告されている (Cruciat *et al.*, 1999)。一方、膜間部に位置する N 末端領域は生物種によって長さが様々であり、出芽酵母 Bcs1 では 44 残基なのに対してヒト BCS1L ではたった 8 残基と短く、相同性が低い (図 6)。この膜間部の N 末端領域は、これまで Bcs1 の機能との関係について言及されておらず機能未知である。先で述べたように一般的な AAA タンパク質は、基質タンパク質の脱凝集や脱会合を機能としているのに対し (5)-1 AAA タンパク質)、Bcs1 は AAA タンパク質ファミリーの特徴を持っていないながら、基質 (Rip1) の会合に働く点において、AAA タンパク質の中でも特異的であるといえる。また、Rip1 が Bcs1 を直接介してマトリクスから内膜の未成熟複合体Ⅲに輸送されるとすると、Rip1 は AAA ドメイン側から N 末端側に輸送されることとなり、一般的な AAA タンパク質の基質輸送と真逆である。さらに「糸通しモデル」に重要である pore ループを有していない等構造的な特徴もあり、これが一般的な AAA タンパク質の機能との差異を生んでいる可能性が考えられる。Bcs1 の機能解析は、AAA タンパク質ファミリーの新たな知見を得る意味でも有意義であると考えられる。

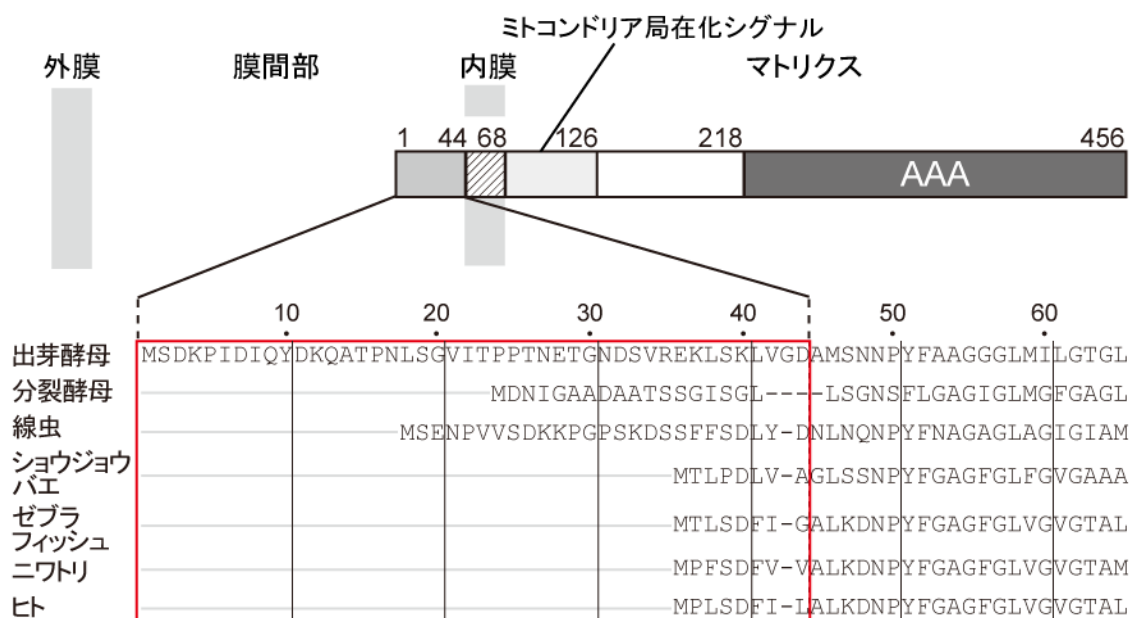


図 6 Bcs1 ホモログと膜間部の N 末端領域

膜間部領域を赤枠で示す。


```

Human  MP-----LSDF-ILALKDNPYFGAGFGLVG 24
Yeast  MSDKPIDIQYDKQATPNLSGVITPPTNETGNDVREKLSKLVGDAMSNNPYFAAGGGLMI 60
Worm   MSENPVV--SDKKPGPSKDS-----SFFSDL-YDNLNQNPFYNAGAGLAG 42
      * . :*.: :.:**** ** **

Human  VGTALALARKGVQLGLVAFRRHYMITLEVPARDRSYAWLLSWLTRHS-TRTQHLSVETSY 83
Yeast  LGTGLAVARSGIIKASRVLYRQMIVDLEIQSKDKSYAWFLTWMAKHPQRVSRHLSVRTNY 120
Worm   IGIAMSFLRRTAQISNTYFRRRFMINLQINNEDAAYPWLLDFINNRSATQTRNLSANTVV 102
      :* .:. . * . : * : : * : : . * :*.:* : : . . : :*.:. *

Human  LQHESGRISTKFEFVPSPGNHFIWYRGKWIRVERSREMOMIDLQ-TGTPWESVTF TALGT 142
Yeast  IQHDNGSVSTKFSLVPGPGNHWIRYKGAFFILIKRERSAKMIDIA-NGSPFETVTLTTLTYR 179
Worm   HQAESGKTELSISFLPHGHGTHFFVHDYRWIKVERQREKQVIQRDGIPTPFETVTLTTLG 162
      * :.* . . :.:*. *.*: : : * : :*. * . :*: :*:*:*:*:

Human  DRKVFFFNILEEARELALQQEEGKTVMYTAVGSEWRPFYPRRRRPLNSVVLQQGLADRIV 202
Yeast  DKHLFDDILNEAKDIALKTTEGKTVIYTSFGPEWRKFGQPKAKRMLPSVILDGSIKEGIL 239
Worm   DVKFFKRMLEQSAKEAIDNAETGLVIYQAVGPQWIRFGVPRKKRDIESVILDGRICEELV 222
      * :.* :*.:. * :. * *:* :*.:* ** * : * : **:* : : : :

Walker A
Human  RDVQEFIDNPKWYTDGIPYRRGYLLYGPPGCGKSSFITALAGELEHSICLLSLTSSLS 262
Yeast  DDVYDFMKNKWKYSDRGIPYRRGYLLYGPPGSGKTSFIQALAGELDYNICILNLSENNLT 299
Worm   EDFQEFISSATWYADRGVYRRGYLFYGPPTGKSSFISALASHFGYSVCLLSLSERTLD 282
      * . :*:. . **:*:*:*:*:*:*:*:*:* **:* ** **.. : :*:*. * : . *

Walker B
Human  DDRLNHLLSVAPQQSIVLLEDVDAAFLSRDIAVENPVKYQGL-GRLTFSGLLNALDGVAS 321
Yeast  DDRLNHLMNMPERSILLLEDIDAAFNKRSTGE-----QGFHSSVTFSGLLNALDGVTS 354
Worm   DDRLNHLNLTAPPNSVILEIDIDAAFVSREDPMSNHPAYQGL-SRVTFSGLLNALDGVAC 341
      *****: . * :*.:*:*:*** . * . . ** : . :*****:..

SRH
Human  TEARIVFMTTNHVDRLDPALIRPGRVDLKEYVGYCSHWQLTQMFQRFYPGQAP-SLAENF 380
Yeast  SEETITFMTTNHPEKLDAAIMRPRIDYKVFVGNATPYQVEKMFMPKFPGET--DICKKF 412
Worm   AEERLTFMTTNYVERLDPALIRPGRVDRKQYFGNATDGMLSKMFSRFYRQPSDVLADDF 401
      :* :.*****: :*:*. * :*:*: * * :.* : : : ** :** : : : :*

Human  AEHVLRA TNQISPAQVQGYFMLYKNDPVGAIHNAESLR-----R 419
Yeast  VNSVKELDITVSTAQLQGLFVMNKDAPHDALKMVSSLRNANHIF 456
Worm   VKRVSEHKTELSPAMIQGHFLMYKQDPRAALDNIKNMF---KTV 442
      . : * . :*. * :** * : : * : * * :. . :

```

図 7 Bcs1 ホモログのアミノ酸配列の相同性

AAA ドメインを構成する各モチーフを赤で示す。一般的な AAA タンパク質で保存されている pore ループ配列の位置を青で示す。Human: ヒト, Yeast: 酵母, Worm: 線虫
 “*” : 完全に一致, “:” : 強い類似性, “.” : 弱い類似性

(T-Coffee プログラム, <http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html>)

5)-5 Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合経路

複合体Ⅲの会合過程において、Bcs1 は Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合に参与する。Rip1 は核 DNA にコードされており、新生 Rip1 前駆体はサイトゾルで合成される (Priest and Hajduk, 1996)。Rip1 前駆体は、トランスロケーターを經由してミトコンドリア外膜と内膜を通過し、一旦マトリクスに輸送される (Priest and Hajduk, 1996)。マトリクスで N 末端のミトコンドリア局在化シグナル配列がプロセシングされた後 (Priest and Hajduk, 1996), 鉄硫黄クラスターを組込み、フォールディングされ Rip1 成熟体となる。この成熟過程で Mzm1 が分子シャペロンとして、Rip1 の安定性に寄与することが示唆されている (Cui *et al.*, 2012)。その後、成熟 Rip1 は Bcs1 を直接的または間接的に介して未成熟複合体Ⅲに会合すると考えられるが、その作用機序は明らかになっていない。

Wagener らは、成熟 Rip1 はリング型六量体を形成した Bcs1 の孔に入り、その状態で未成熟複合体Ⅲまで輸送され、引き渡されるという仮説を提唱している (図 8) (Wagener *et al.*, 2011)。一般的な AAA タンパク質は、基質をアンフォールディングさせるとともに孔を通すと考えられている (「糸通しモデル」) (Yamada-Inagawa *et al.*, 2003)。また、その時の基質は N 末端側から AAA ドメイン側へ輸送される。つまり、Bcs1 が鉄硫黄クラスターを組込んだ (フォールディングした) 状態の成熟 Rip1 を AAA ドメイン側から N 末端側へ輸送するという仮説は、Bcs1 が明らかに通常の AAA タンパク質とは異なる機能と作用機序を有している可能性があることを示している。

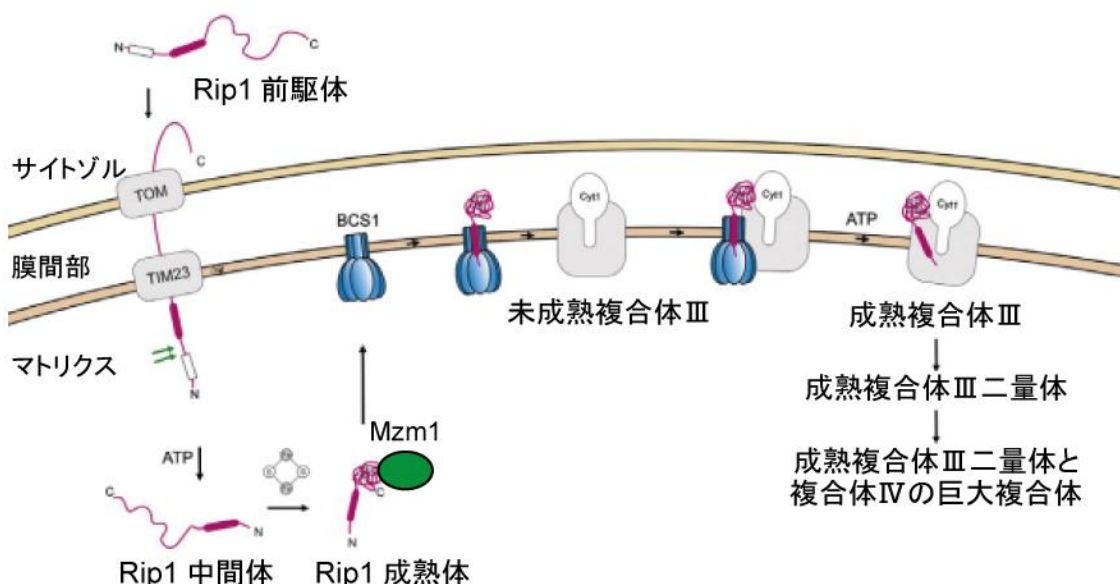


図 8 Bcs1 の Rip1 輸送仮説 (Wagener and Neupert, 2012 改変)

Wagener らの仮説とともに、Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの組込みにおける Bcs1 の役割として図9の①もしくは②の可能性が考えられる。すなわち、①何らかの未知の機構によって、内膜へ挿入された Rip1 が Bcs1 を介して未成熟複合体Ⅲへ会合する経路、② Bcs1 を直接介して未成熟複合体Ⅲへ会合する二つの経路である。

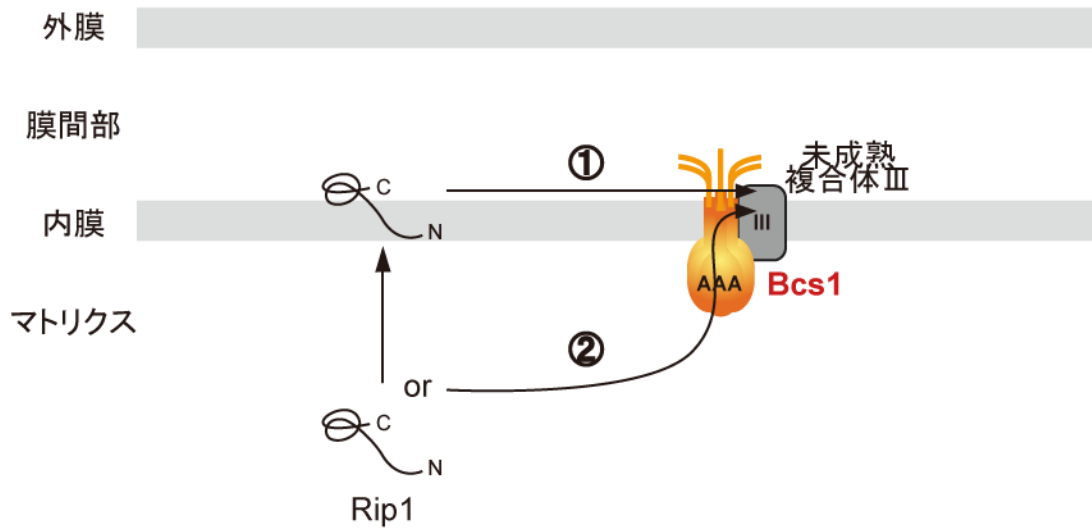


図9 Rip1 の会合経路モデル

①何らかの未知の機構によって、内膜へ挿入された Rip1 が Bcs1 を介して未成熟複合体Ⅲへ会合する経路、②Bcs1 を直接介して未成熟複合体Ⅲへ会合する二つの経路

5)-6 *bcs1* 欠失株における Rip1 量の減少とプロテアーゼの関係性

bcs1 欠失株 ($\Delta bcs1$) で Western blotting における Rip1 の検出量が減少することから (図 10, (A)) (Nobrega *et al.*, 1992), Rip1 は転写レベルでの制御を受けているか, もしくは未会合 Rip1 がプロテアーゼにより分解されると考えられる。一般的に呼吸鎖複合体に会合されなかったサブユニットは, ミトコンドリア内のプロテアーゼによって分解される (Tatsuta, 2009)。ミトコンドリアマトリクスに局在する Lon プロテアーゼの欠失 ($\Delta pim1$) により, Rip1 の検出量が増加することから (図 10, (B)) (Bayot *et al.*, 2010), 未会合 Rip1 は Lon プロテアーゼによって分解されている可能性が高い。ただし, Rip1 はミトコンドリアでの成熟過程で異なった局在を示すため, 他のプロテアーゼも Rip1 の分解に関与している可能性がある。

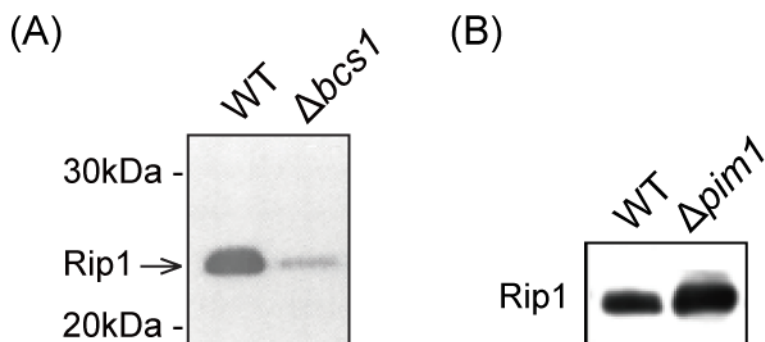


図 10 *bcs1* 欠失株と Lon プロテアーゼ欠失株での Rip1 量の増減

(A) *bcs1* 欠失株 ($\Delta bcs1$) で Rip1 検出量が減少する (Nobrega *et al.*, 1992 改変)

(B) Lon プロテアーゼ欠失株 ($\Delta pim1$) で Rip1 検出量が増加する (Bayot *et al.*, 2010 改変)

5)-7 本研究の目的

ヒト **BCS1L** の変異はヒト疾患を引き起こすことが報告されているが、そのメカニズムの解析は大きく進んではいない。その理由として、**Bcs1** は呼吸活性に必須のタンパク質であり、多細胞生物において **Bcs1** が欠失すると増殖不全となることから、変異体の解析が困難なためである。一方、酵母は発酵（解糖系からのエネルギー）のみで増殖可能であるため、呼吸活性を失っても発酵培地上で増殖することができる。また、非発酵培地での増殖は呼吸活性に依存することから、呼吸鎖の必須因子の機能欠損を細胞の増殖で評価できる。さらに、酵母は遺伝学的手法が確立しており、遺伝子操作を容易に行うことができるため、様々な変異株を作製することが可能である。酵母 **Bcs1** とヒト **BCS1L** はアミノ酸配列に高い相同性を持っており、酵母 *bcs1* 欠失株 ($\Delta bcs1$) の非発酵培地上における増殖不全をヒト **BCS1L** が相補できることから (図 11) (de Lonlay *et al.*, 2001; Visapää *et al.*, 2002)、機能も保存されていると考えられる。そこで、本研究では酵母 **Bcs1** の遺伝・生化学的解析を行った。

現在までに明らかになっている **Bcs1** の機能は **Rip1** の未成熟複合体Ⅲへの会合であるが、その会合経路については未だ不明な点が多いため、本研究では **Rip1** の会合経路を明らかにするための解析を行った。同時に、**Bcs1** の他の機能の可能性についても解析を行った。

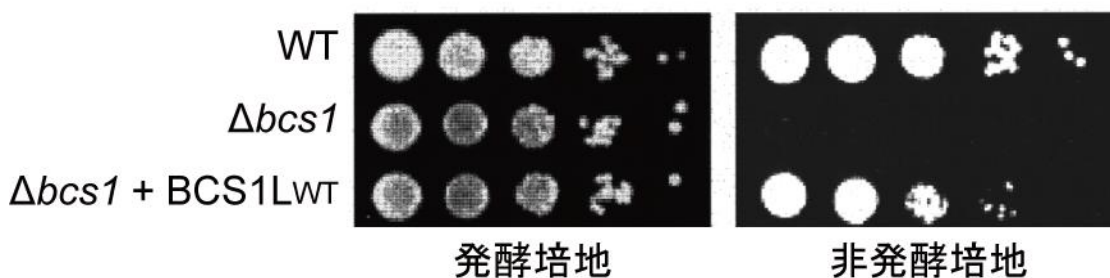


図 11 呼吸活性実験

酵母 *bcs1* 欠失株 ($\Delta bcs1$) の呼吸不全をヒト **BCS1L** が相補する (de Lonlay *et al.*, 2001 改変)

6) 実験方法

6)-1 株と培養条件

6)-1-1 大腸菌

本研究で遺伝子組み換えに使用した大腸菌を表 2 に示し、培養には以下の培地を使用した。

・ LB 培地 : 0.5% Bacto Yeast Extract, 1.0% Bacto-Tryptone, 1.0% NaCl

・ MMI 培地 : 2.5% Bacto Yeast Extract, 1.25% Bact-Tryptone, 0.85% NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.4% glycerol

寒天培地の場合は、更に 20 g/L Agarose を添加した。

形質転換に用いた大腸菌の培養には LB 培地を使用し、プラスミドの保持のために必要に応じて 50 µg/mL Amp を培地に添加した。また、プラスミド回収のための増殖には MMI 培地を用いた。培養はすべて 37°C で行った。

表 2 本研究で使用した大腸菌株

菌株	遺伝子型
TG1	<i>supE, hsdΔ5, thi, Δ(lac-proAB)/F'</i> [<i>traD36, proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15</i>]
BL21(DE3)	<i>F', ompT, hsdS_B (r_B-m_B-), gal (λ cI857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7 gene1), dcm (DE3)</i>

6)-1-2 酵母

本研究で使用した酵母菌株を表 3 に示し、培養には以下の培地を使用した。

・ YPAD 培地: 1.0% Bacto Yeast Extract, 2.0% Bacto Peptone, 2.0% glucose, 0.004% adenine

・ SD-Ura 培地: 0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 2.0% glucose, 0.077% Complete Supplement Drop out -Ura

・ S.Lactate-Ura 培地: 0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, 2.0% lactate, 0.077% Complete Supplement Drop out -Ura

寒天培地の場合は、更に 20 g/L Agarose を添加した。

形質転換に用いた酵母の培養には、YPAD 培地を使用した。また、プラスミドの保持のため、選択培地として SD-Ura 培地を用いた。呼吸活性実験には、発酵培地として SD-Ura 培地、非発酵培地として S.Lactate-Ura 培地を用いた。培養はすべて 30°C で行った。

欠失株の作製は、以下のように行った。酵母 *bcs1* 欠失株 ($\Delta bcs1$) は、染色体上の *BCS1* 遺伝子座を KanMX6 カセット (Bähler *et al.*, 1998) に置換した株である (村本, 2009)。プロテアーゼ欠失株については、欠失させたいプロテアーゼの遺伝子に対応したプライマー対 (表 4) を用いて BYP1804 (文部科学省 NBRP 「酵母」) をテンプレートとして

PCR を行い、当該遺伝子の 5' UTR と 3' UTR の間に *CgHIS3* を含むフラグメントを作製し、野生型一倍体酵母株 W303-1A と $\Delta bcs1$ を形質転換し、染色体上の目的遺伝子を欠失した株を作製した。形質転換の確認は、野生株と各欠失株を用いてコロニーPCR を行い、欠失目的遺伝子座を増幅後、その産物の分子量の違いを指標に行った。コロニーPCR には、各遺伝子に対応した check 用プライマー対 (表 4) を用いた。

表 3 本研究で使用した酵母株

菌株	遺伝子型	出典
W303-1A	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i>	Bähler <i>et al.</i> , 1998
$\Delta bcs1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta bcs1::kanMX6</i>	村本, 2009
$\Delta yme1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta yme1::CgHIS3</i>	本研究
$\Delta yta12$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta yta12::CgHIS3</i>	本研究
$\Delta mcx1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta mcx1::CgHIS3</i>	本研究
$\Delta pim1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta pim1::CgHIS3</i>	本研究
$\Delta yme1/\Delta bcs1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta yme1::CgHIS3</i> , <i>\Delta bcs1::kanMX6</i>	本研究
$\Delta yta12/\Delta bcs1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta yta12::CgHIS3</i> , <i>\Delta bcs1::kanMX6</i>	本研究
$\Delta pim1/\Delta bcs1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta pim1::CgHIS3</i> , <i>\Delta bcs1::kanMX6</i>	本研究
$\Delta mcx1/\Delta bcs1$	<i>MATa</i> ρ^+ , <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>\Delta mcx1::CgHIS3</i> , <i>\Delta bcs1::kanMX6</i>	本研究

表 4 本研究で使用した酵母株の作製に用いたプライマー

菌株	プライマー	塩基配列
<i>Δyme1, Δyme1/Δbcs1</i>		
	Sc_del_yme1_F-cg	5'-GCAATTTTAAATTATAATACATTGTGGATAGAACGAAAACA GAGACGTGATAGTTGGGACGCTCGAAGGC-3'
	Sc_del_yme1_R-cg	5'-CATTCTCGGTCTTGAGGTAGGTTCCCTTCATACGTTTAACTTC TTAGAATAAAAGTAAAACGACGGCCAGT-3'
	Sc_check_yme1-F	5'-CTTCGAGGAGTGGTAGCTCCTGTAC-3'
	Sc_check_yme1-R	5'-CTCCTTACGAATAATCTGAAGTTTCAAGC-3'
<i>Δyta12, Δyta12/Δbcs1</i>		
	Sc_del_yta12_F-cg	5'-TATAGCACACTCAAGAGTCTTGGCAAGCAACTTTAAAGTT AGAAAGAGTACTATTGGGACGCTCGAAGGC-3'
	Sc_del_yta12_R-cg	5'-AGCAAGATATGTAGAACAGTCTTCCTCCATTTCTTTGTATTG TGAAATATCAAGTAAAACGACGGCCAGT-3'
	Sc_check_yta12-F	5'-CTAATCACCAAGCTATCTGGTGTC-3'
	Sc_check_yta12-R	5'-CAGCCTCACAGAAGCGCTTTGATC-3'
<i>Δpim1, Δpim1/Δbcs1</i>		
	Sc_del_pim1_F-cg	5'-GTTTTTCTTTTGGTTTTTCGAGGTGCTTGAACGAAAAGATT TGCAAATAGAGCTTGGGACGCTCGAAGGC-3'
	Sc_del_pim1_R-cg	5'-TTTAAATATTTACAGAATGTTTAAACAGGTATTTAATCCATT TAGATGAAAAGGTAAAACGACGGCCAGT-3'
	Sc_check_pim1-F	5'-GTTTGCCACCGGAAGGAAATAAGTC-3'
	Sc_check_pim1-R-2	5'-CACGCGATTCCGCCATCTTGGGTTTCCCAC-3'
<i>Δmcx1, Δmcx1/Δbcs1</i>		
	Sc_del_mcx1_F-cg	5'-CAAGGCACTCTAATTACATTTACACTCTTGGGACGCTCGA AGGC-3'
	Sc_del_mcx1_R-cg	5'-TTATATATTCTATACCATTCATTTTTTTGTAAAACGACGGCC AGT-3'
	Sc_check_mcx1-F-2	5'-CGATGATAGAAGGGAATAAGTCATCAGTGG-3'
	Sc_check_mcx1-R-2	5'-GATAAGGAGTAGTCTCCCAGTATCGTAG-3'

6)-2 プラスミド

本研究で使用したプラスミドを表 5, それぞれのプラスミドを作製するのに使用したプライマーを表 6 に示した。酵母でのタンパク質発現には, pRS315, pRS316 及び pME661 を使用した。pME661 については, 指導教官である江崎雅俊助教から提供いただいたものを用いた。

pRS316/*BCS1* (pME1001) は, プロモーター領域を含む *BCS1* 全長ゲノム DNA を持つプラスミドである。酵母 *BCS1* 遺伝子の ORF と 484 bp 5' 側上流域及び 140 bp 3' 側下流域を D41 と C38 プライマーを用い, 全ゲノム DNA 抽出液をテンプレートとして PCR で増幅した。PCR 産物 (1991 bp) を *SacI* と *XhoI* で切断し, pRS316 の *SacI*-*XhoI* サイトに挿入した。今回検討した変異型 *Bcs1* を発現するプラスミドは, 改変メガプライマー法 (Molecular Cloning, 3rd edition) で作製した。具体的には 2 段階の PCR を行い, *SacI* と *XhoI* で挟まれた目的の DNA 配列を作製する。1 段階目の PCR (1st PCR) では, 表 6 で記す変異に対応したプライマーとプライマー-D27 のセットで pME1001 を鋳型として PCR を行った。反応には PrimeSTAR (TaKaRa) を用いた。増幅産物は Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製した。2 段階目の PCR (2nd PCR) では, プライマー-C37 とプライマー-A27, 精製した増幅産物及び pME1001 を用いて PCR を行った。再び増幅産物を Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製した。精製した増幅産物を *SacI* と *XhoI* で切断し, pRS316 に挿入した。作製したプラスミドは, シークエンスにより DNA 配列が正しいかどうかを確認した。シークエンスには, 発生医学研究所のシークエンス支援を利用した。野生型 *Bcs1* と His-tag 付野生型 *Bcs1* の過剰発現用プラスミドは, *BamHI* と *NotI* で挟まれた目的の DNA 配列を作製し, pME661 の *BamHI* -*NotI* サイトに挿入した。*Atm1* と *Pim1* の発現用プラスミドは pME1001 と同様に作製した。*Atm1* の発現用プラスミドは, *SacI*-*XhoI* で挟まれた目的の DNA 配列を表 6 で対応するプライマーを用いて作製し, pRS316 の *SacI*-*XhoI* サイトに挿入した。*Pim1* の発現用プラスミドは, *SacI* と *NotI* で挟まれた目的の DNA 配列を表 6 で対応するプライマーを用いて作製し, pRS315 の *SacI*-*XhoI* サイトに挿入した。

表 5 本研究で使用した *BCS1* 関連プラスミド

プラスミド	ベクター	特徴	出典
pRS315		シングルコピー <i>LEU2</i> マーカー	Sikorski and Hieter, 1989
pRS316		シングルコピー <i>URA3</i> マーカー	Sikorski and Hieter, 1989
pME661		マルチコピー <i>ADH1</i> プロモーター	江崎

pRS316/ <i>BCS1</i> (pME1001)	pRS316	野生型 Bcs1	村本, 2009
pSR1001	pRS316	Δ 2-40 Bcs1	本研究
pSR1002	pRS316	Δ 2-65 Bcs1	本研究
pSR1003	pRS316	Δ 2-10 Bcs1	本研究
pSR1004	pRS316	Δ 11-20 Bcs1	本研究
pSR1005	pRS316	Δ 21-30 Bcs1	本研究
pSR1006	pRS316	Δ 31-40 Bcs1	本研究
pSR1007	pRS316	Δ 2-30 Bcs1	本研究
pSR1008	pRS316	Δ 31-34 Bcs1	本研究
pSR1009	pRS316	Δ 35-37 Bcs1	本研究
pSR1010	pRS316	Δ 38-40 Bcs1	本研究
pSR1011	pRS316	Δ 2-37Bcs1	本研究
pSR1012	pRS316	Δ 38 Bcs1	本研究
pSR1013	pRS316	Δ 2-38 Bcs1	本研究
pSR1014	pRS316	Δ 41-44 Bcs1	本研究
pSR1015	pRS316	Δ 39 Bcs1	本研究
pSR1016	pRS316	Δ 40 Bcs1	本研究
pSR1017	pRS316	L38A Bcs1	本研究
pSR1018	pRS316	L38G Bcs1	本研究
pSR1019	pRS316	L38D Bcs1	本研究
pSR1020	pRS316	L38K Bcs1	本研究
pSR1021	pRS316	L38T Bcs1	本研究
pSR1022	pRS316	L38N Bcs1	本研究
pSR1023	pRS316	L38R Bcs1	本研究
pSR1024	pRS316	L38C Bcs1	本研究
pSR1025	pRS316	L38Q Bcs1	本研究
pSR1026	pRS316	L38E Bcs1	本研究
pSR1027	pRS316	L38H Bcs1	本研究
pSR1028	pRS316	L38I Bcs1	本研究
pSR1029	pRS316	L 38M Bcs1	本研究
pSR1030	pRS316	L38F Bcs1	本研究
pSR1031	pRS316	L38P Bcs1	本研究
pSR1032	pRS316	L38S Bcs1	本研究
pSR1033	pRS316	L38W Bcs1	本研究

pSR1034	pRS316	L38Y Bcs1	本研究
pSR1035	pRS316	L38V Bcs1	本研究
pSR1036	pRS316	D41P/L42P Bcs1	本研究
pSR1037	pME661	Bcs1 過剰発現	本研究
pSR1038	pME661	Bcs1-His 過剰発現	本研究
pSR1039	pRS316	Atm1-myc	本研究
pSR1040	pRS315	Pim1	本研究

表 6 本研究で使用したプライマー

プライマー	プラスミド	塩基配列
D41	pME1001	5'-GAACTCGAGCTGGATGATCAGGTGCCACAC-3'
C38		5'-GACGAGCTCGTATTTTTAAGCCTCTTTATC-3'
D27	(1 st PCR)	5'-CAGTGGTATTTGTGAGCTCGTATTTTTAAG-3'
C37	(2 nd PCR)	5'-GAACTCGAGCTTTCTAAATGAATGAATGAG-3'
A27	(2 nd PCR)	5'-TCGATCTCAGTGGTATTTGTG-3'
A-01	pSR1001	5'-CCCTCAATCTACCATGCTAGTTGGCGATGC-3'
A-02	pSR1002	5'-CCCTCAATCTACCATGGCTGTAGCTAGATC-3'
A-03	pSR1003	5'-GCCCTCAATCTACCATGGATAAACAGGCTACTCC-3'
A-04	pSR1004	5'-CCGATTGACATAACAATATGTAATTACTCCGCCAAC-3'
A-05	pSR1005	5'-ACTCCAAATCTGAGTGGTAATGACTCAGTCCGGGAAAAAC-3'
A-06	pSR1006	5'-GCCAACAAATGAACTGGTCTAGTTGGCGATGCTATGTC-3'
A-07	pSR1007	5'-CCCTCAATCTACCATGAATGACTCAGTCC-3'
A-08	pSR1008	5'-CAAATGAACTGGTCGGGAAAAACTTTC-3'
A-09	pSR1009	5'-GTAATGACTCAGTCCTTTCAAAAGTAGTTG-3'
A-10	pSR1010	5'-CTCAGTCCGGGAAAAACTAGTTGGCGATGC-3'
A-11	pSR1011	5'-CTCAATCTACCATGCTTTCAAAAGTAGTTG-3'
A-12	pSR1012	5'-TCAGTCCGGGAAAAATCAAAAAGTAGTTGGC-3'
A-13	pSR1013	5'-CTCAATCTACCATGTCAAAAAGTAGTTGGC-3'
A-14	pSR1014	5'-GGAAAACTTTCAAAAGCTATGTCAAACAA-3'
A-15	pSR1015	5'-TCCGGGAAAAACTTAAAGTAGTTGGCGATG-3'
A-16	pSR1016	5'-CCGGGAAAACTTTCAGTAGTTGGCGATGC-3'
B-14	pSR1017	5'-CAGTCCGGGAAAAAGCTTCAAAAAGTAGTTGGC-3'
B-17	pSR1018	5'-GTCCGGGAAAAAGGTTCAAAAAGTAGTTGGC-3'
B-18	pSR1019	5'-GTCCGGGAAAAAGATTCAAAAAGTAGTTGGC-3'

B-19	pSR1020	5'-GTCCGGGAAAAAAGTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-20	pSR1021	5'-GTCCGGGAAAAAAGTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-21	pSR1022	5'-GTCCGGGAAAAAATTCAAAACACTAGTTGGC-3'
B-37	pSR1023	5'-GTCCGGGAAAAACGTTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-38	pSR1024	5'-GTCCGGGAAAAATGTTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-39	pSR1025	5'-GTCCGGGAAAAACAGTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-40	pSR1026	5'-GTCCGGGAAAAAGAGTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-41	pSR1027	5'-GTCCGGGAAAAACATTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-42	pSR1028	5'-GTCCGGGAAAAAATTTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-43	pSR1029	5'-GTCCGGGAAAAAATGTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-44	pSR1030	5'-GTCCGGGAAAAATTTTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-45	pSR1031	5'-GTCCGGGAAAAACCTTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-46	pSR1032	5'-GTCCGGGAAAAATCTTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-47	pSR1033	5'-GTCCGGGAAAAATGGTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-48	pSR1034	5'-GTCCGGGAAAAATATTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-49	pSR1035	5'-GTCCGGGAAAAAGTTTCAAACACTAGTTGGC-3'
B-36	pSR1036	5'-GGGAAAAACTTTCACCACCAGTTGGCGATG-3'
C-02	pSR1037	5'-ACGTGCGGCCGCTTAGAAAATATGATTAGCGTTCC-3'
C-03		5'-CCGCGGATCCAAAAACGAAGTGTGCCCTC-3'
C-06	pSR1038	5'-ACGTGCGGCCGCTTAGTGATGATGATGATGATGATGATGATGA TGATGGAAAATATG-3'
Atm1_c_m yc_F	pSR1039	5'-AAGATCTGGATCATTAGAGAATGAACTAAAAGACCAGCAAG AACTAGAACAAAAGTTGATTTCTGAAGAAGATTTGTAAGGCCGC ATCATGTAATTAGT-3'
Atm1_ REV		5'-CTTAAATCTTGAAAACTTATACATGTATAAATCAATATTTACTT ACGAGCGTGTAACGACGGCCAGT-3'
ScPim1--42 0NotI	pSR1040	5'-GTAGCGGCCGCTAATGTATGAGCAGGACG-3'
ScPim1-+3 87SalI		5'-GACGTGACAATCATCTTCCTCACGTCTAC-3'

6)-3 呼吸活性実験

Bcs1 の細胞機能を解析するため、 $\Delta bcs1$ を野生型 Bcs1 発現プラスミド、変異型 Bcs1 発現プラスミド及びコントロールベクターで形質転換した。それぞれの形質転換体について、下記の方法で SD-Ura 培地と S.lactate-Ura 培地での増殖を調べた。

酵母を約 $OD_{600} = 1.0$ まで増殖させ、 1.0×10^{-3} , 1.0×10^{-4} , 1.0×10^{-5} , 1.0×10^{-6} OD_{600} unit/5 μ L になるよう滅菌蒸留水で希釈した。各希釈液を 3 μ L もしくは 5 μ L ずつ寒天培地上に滴下した。寒天培地は 30°C で 2-4 日間培養した。

6)-4 ミトコンドリアの単離

Bcs1 変異株は SD-Ura 培地、プロテアーゼ欠失株は YPAD 培地で吸光度 $OD_{600} = 1.0-1.5$ になるまで 30°C で培養した。1 L の培養液を遠心管に移し、JLA-10.500 ローター (Beckman) で 5,000 rpm, 5 分間, 25°C で遠心し、集菌した。上清を捨て、細胞を 100 mL の蒸留水で懸濁し、5,000 rpm, 5 分間, 25°C で遠心した。再び上清を捨て、沈殿した細胞の湿重量を測定した。50 mL の 0.1 M Tris- SO_4 (pH 9.4), 10 mM DTT に懸濁し、30°C の恒温槽で 15 分間振盪した。5,000 rpm, 5 分間, 25°C で遠心後、沈殿した細胞に 50 mL の 1.2 M Sorbitol buffer (1.2 M Sorbitol, 20 mM KPi (pH 7.4)) に懸濁し、再度同条件で遠心して細胞を回収した。40 mL の 1.2 M Sorbitol buffer に懸濁後、Zymolyase 20 T を細胞の湿重量 1 g あたり 5 mg 添加した。30°C の恒温槽で 20-30 分間振盪した。この間に遠心機とローターを 4°C に冷やし始め、以降の操作は氷上で行った。Zymolyase 20 T で細胞膜が溶解 (スフェロプラスト化) しているかどうかを確認するために、20 μ L の細胞懸濁液を 1 mL の水もしくは 1.2 M Sorbitol buffer に懸濁した。スフェロプラストを水に懸濁すると、浸透圧により細胞が破壊され懸濁液の濁度が低下し透明化するのに対し、1.2 M Sorbitol buffer に懸濁しても濁度に変化はない。この性質を利用し、スフェロプラスト化を確認した。確認後、3,500 rpm, 5 分間, 4°C で遠心し、スフェロプラストを回収した。30 mL 1.2 M Sorbitol buffer で懸濁し、3,500 rpm, 5 分間, 4°C で遠心した。これを二回繰り返した。次に、30 mL の Breaking buffer (0.6 M Mannitol, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 1 mM PMSF) に懸濁したスフェロプラストをダウンス型ホモジナイザーに移し変え、15 回ストロークを行いホモジナイズした。ホモジナイズした液を遠心管に移し、JLA-25.50 ローター (Beckman) で 3,500 rpm, 10 分間, 4°C で遠心した。上清を別の遠心管に回収、氷上に保存した。沈殿を 30 mL の Breaking buffer で懸濁して再度 15 回ストロークを行いホモジナイズし、遠心管に移して 3,500 rpm, 10 分間, 4°C で遠心後、上清を別の遠心管に回収して氷上に保存した。保存した上清を 10,000 rpm, 10 分間, 4°C で遠心後、沈殿を 30 mL の Breaking buffer で懸濁した。懸濁液を 3,500 rpm, 10 分間, 4°C で遠心後、上清を別の遠心管に回収して氷上に保存した。保存した上清を 10,000 rpm, 10 分間, 4°C で遠心後、沈殿を 30 mL の SEM buffer (250 mM Sucrose, 10 mM

MOPS-KOH (pH 7.2), 1 mM EDTA) に懸濁した。10,000 rpm, 10 分間, 4°C で遠心後, 沈殿を 200 μ L の SEM buffer に懸濁した。ミトコンドリアの濃度を測定するため, 990 μ L の 0.6% SDS 溶液にミトコンドリア懸濁液 10 μ L を加えて 95°C で 5 分間加熱し, 280 nm の吸光度を測定した。測定値が OD₂₈₀ = 0.21 (10 mg/mL) になるよう SEM buffer で希釈した。サンプルを分注し, -80°C で保存した。以上の操作を図 12 に示した。

培養液	沈殿
↓ 5,000rpm, 5min, 25°C	↓ + 30ml Breaking buffer, 再懸濁
沈殿	↓ ダウンス型ホモジナイザーに移す
↓ + 100ml dH ₂ O, 再懸濁	↓ ホモジナイズ(15回ストローク)
↓ 5,000rpm, 5min, 25°C	↓ 3,500rpm, 5min, 4°C
沈殿	↓ * 2回繰り返す
↓ 細胞湿重量測定	上清
↓ + 50ml Tris-SO ₄ buffer, 再懸濁	↓ 10,000rpm, 10min, 4°C
↓ 15min, 30°C, 振盪	沈殿
↓ 5,000rpm, 5min, 25°C	↓ + 30ml Breaking buffer, 再懸濁
沈殿	↓ 3,500rpm, 5min, 4°C
↓ + 50ml 1.2M Sorbitol buffer, 再懸濁	上清
↓ 5,000rpm, 5min, 25°C	↓ 10,000rpm, 10min, 4°C
沈殿	沈殿
↓ + 40ml 1.2M Sorbitol buffer, 再懸濁	↓ + 30ml SEM buffer, 再懸濁
↓ + zymolyase 20T 5 mg/g of cells	↓ 10,000rpm, 10min, 4°C
↓ 20-30min, 30°C, 振盪	沈殿
↓ (以降の操作は, 氷上で行う)	↓ + 200 μ L SEM buffer, 再懸濁
↓ スフェロプラスチ化確認	↓ 吸光度測定(石英セル, OD ₂₈₀)
↓ 3,500rpm, 5min, 4°C	↓ + SEM buffer 適量
沈殿	ミトコンドリア(10 mg/mL)
↓ + 50ml 1.2M Sorbitol buffer, 再懸濁	↓ 分注
↓ * 2回繰り返す	-80°C, 保存

図 12 ミトコンドリアの単離操作

6)-5 Rip1 タンパク質の精製と抗体作製

Rip1 の 31-C 末端残基をコードする DNA 断片を pET15b にクローニングした。シーケンスで配列を確認後、このプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した。50 µg/mL Amp 添加 LB 液体培地で一晚培養し、OD₆₀₀ = 0.1 になるよう希釈後、37°C で培養した。OD₆₀₀ = 0.5 になったところで、0.1 mM IPTG を添加し、さらに 2 時間培養した。遠心により大腸菌を沈殿させ、-20°C で凍結した。融解後、sonication buffer を加え、ソニケーションを行った(以降、ソニケーションは全て浴槽型で行った)。遠心後、沈殿を 2% Triton X-100 buffer に懸濁し、ソニケーションを行った。再び遠心し、沈殿を 5 M Urea buffer に懸濁後、ソニケーションを行った。再度遠心後、沈殿を 8 M Urea buffer に懸濁し、ソニケーションを行った。遠心後、上清を回収し 1 mL あたり 250 µL 分の Ni NTA agarose (QIAGEN) と室温で 2 時間反応させた。カラム (Micro Bio-Spin[®] Chromatography Columns, BIO RAD) に Ni NTA agarose を移し、wash buffer で 3 回洗浄後、elution buffer で溶出した。得られた Rip1 タンパク質を用いたウサギ抗体作製には、抗体作製受託サービス (MBL) を利用した。使用した試薬を表 7 に示した。

表 7 Rip1 タンパク質の精製と抗体作製で使用した試薬

試薬	組成
sonication buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, protease inhibitor cocktail (Nacalai tesque)
2% TritonX-100 buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2% TritonX-100
5M Urea buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 M Urea
8M Urea buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 8 M Urea
wash buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM imidazole
elution buffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 300 mM imidazole

6)-6 Western blotting

酵母から抽出した全タンパク質またはミトコンドリアに SDS sample buffer を加えて 5 分間、95°C で処理した。目的に応じた濃度のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、泳動後 PVDF メンブレンにセミドライ法 (EzBlot, ATTO) または Wet 法で転写した。メンブレンを 5% スキムミルクでブロッキングした後、Solution 1 (Immunoreaction Enhancer solution of primary antibody, Toyobo) で一次抗体を適切な濃度に希釈し、一晚、室温で反応させた。TBS-T buffer でメンブレンを 10 分間振盪する作業を 3 回繰り返し洗浄した後、Solution 2 (Immunoreaction Enhancer solution of secondary antibody, Toyobo) で二次抗体を適切な濃度に希釈し、1.5 時間以上、室温で反応させた。TBS-T buffer でメンブレンを 10 分間振盪する作業を 3 回繰り返し洗浄した後、メンブレンの水分を取除き、Typhoon Trio⁺ (GE Healthcare) で検出した。検出に用いた一次抗体は目的タンパク質に対するウサギ抗体を用い、二次抗体は cy5 標識抗ウサギ抗体 (蛍光抗体) を用いた。一次抗体については、抗 Bcs1 抗体を Dr. Rosemary Stuart (Marquette University, USA) から、抗 Tom44 抗体、抗 Cytochrome *c*₁ 抗体、抗 Cytochrome *b*₂ 抗体、抗 Tim44 抗体及び抗 F₁β 抗体を遠藤斗志也教授 (名古屋大学) から提供いただいたものを用いた。表 8 に Western blotting で使用した試薬を示した。

表 8 Western blotting に用いた試薬

試薬名	組成
3×SDS sample buffer	150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6% SDS, 15% sucrose, 0.015% BPB
TBS-T buffer	25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween20
Transfer buffer (Wet 法)	1.2% Tris, 1.44% glycine, 20% methanol

6)-7 Blue Native-PAGE

単離したミトコンドリア 20 μL を 12,000 rpm (TMA-4 ローター, TOMY), 5 分間、4°C で遠心し、沈殿を 40 μL の 1% digitonin buffer で懸濁した。氷上で 30 分間インキュベート後、12,000 rpm (TMA-4 ローター, TOMY), 30 分間、4°C で遠心した。上清を回収し、BlueNative-PAGE sample buffer を添加して、適切な濃度のグラジエントゲルで電気泳動した。泳動には、Anode buffer と CBB を含む Cathode buffer を用いた。10 mA で約 20 分間泳動後、Cathode buffer を CBB 非添加の Cathode buffer へと交換し、その後、20 mA で約 90 分間泳動した。電気泳動後は、ゲルを Blot buffer に移し入れ、60°C で 1 時間インキュベートした後、Wet 法で PVDF 膜に転写した。転写後は、脱色液にメンブレンを浸して CBB を適度に脱色した後、Western blotting と同様の操作を行った。表 9 に Blue Native-PAGE で使用した試薬を示した。

表 9 Blue Native-PAGE で使用した試薬

試薬	組成
1% digitonin buffer	1% digitonin, 50 mM potassium acetate, 30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10% glycerol, 1 mM PMSF
10×BlueNative-PAGE sample buffer	5% CBB G250, 100 mM Bis-Tris (pH 7.0), 500 mM 6-aminocapionic acid
Anode buffer	50 mM Bis Tris-HCl (pH 7.0)
Cathod buffer	15 mM Bis Tris-HCl (pH 7.0), 50 mM Tricine, 0.02% CBB G250
Blot buffer	100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 4% 2-ME
脱色液	45% Methanol, 10% acetic acid

6)-8 Proteinase K 消化実験

単離したミトコンドリアに SEM buffer で希釈した digitonin (0.05%, 0.1%) または 1% Triton X-100 を添加し, 15°C で 5 分間反応させた。PMSF を 1 mM になるよう添加して反応を止め, SDS sample buffer を加えて 5 分間, 95°C で処理した。その後は Western blotting と同様の操作を行った。

6)-9 化学架橋実験

単離したミトコンドリアに SEM buffer で希釈した架橋剤 DTSSP を終濃度 3 mM になるよう添加し, 25°C で 30 分間インキュベートした。終濃度 10 mM となるよう Tris-HCl (pH 8.0)を加えて反応を止め, SDS-PAGE サンプル buffer を添加し, 5 分間, 95°C で処理した。その後は Western blotting と同様の操作を行った。

6)-10 超遠心による不溶性タンパク質・可溶性タンパク質の分離

単離したミトコンドリア 10 μ L を 12,000 rpm (TMA-4 ローター, TOMY), 5 分間, 4°C で遠心し, 沈殿に 50 μ L の 10 mM MOPS-KOH (pH 7.2)を添加した。ソニケーション処理で細胞を破碎後, 436,000 g (100,000 rpm, TLA 100.2 ローター, Beckman), 30 分間, 4°C で遠心分離した。上清を 1.5 mL チューブに移し SDS sample buffer を添加, 沈殿は SDS sample buffer で懸濁し, 5 分間, 95°C で処理した。その後は Western blotting と同様の操作を行った。

6)-11 RT-PCR

Fast Pure[®] RNA Kit (TaKaRa) を用い、total RNA を精製した。RNA の純度と濃度を Nano Drop[®] ND-1000 (Thermo) で測定し、25 pg/μL になるよう希釈した。One Step SYBR[®] RT-PCR Kit II (TaKaRa) を使用し、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で測定した。使用したプライマーを表 10 に示した。

表 10 本研究で使用したプライマー

プライマー	塩基配列
RTpcr-Rip1-mRNA_F	5'-CCGATGCTGACAGAGTCAAA-3'
RTpcr-Rip1-mRNA_R	5'-ATGGCAAGGACAGAACCAAC-3'

6)-12 膜電位測定

単離したミトコンドリアを用いて、以下の手順で行った。

1.8 μL の Buffer (600 mM mannitol, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 40 mM KPi (pH 7.4), 0.25% BSA) に 0.1 M ATP または 0.1 M NADH を 100 μL, 1 M MgCl₂ を 30 μL, 2 mM DiSC₃(5) を 2 μL ずつ順に添加した。蛍光分光器を用いて励起光 (622 nm), 蛍光 (677 nm) の条件で継時的に測定した。測定を開始した 60 秒後にミトコンドリア (10 mg/mL) (図 13, mito.) を 20 uL 添加した。測定開始点から 500 秒後、1 mg/mL バリノマイシン (図 13, Val.) を 10 μL 添加し、測定開始から 1000 秒後まで測定した。吸光度の測定は、FP -750 (JASCO) で行った。

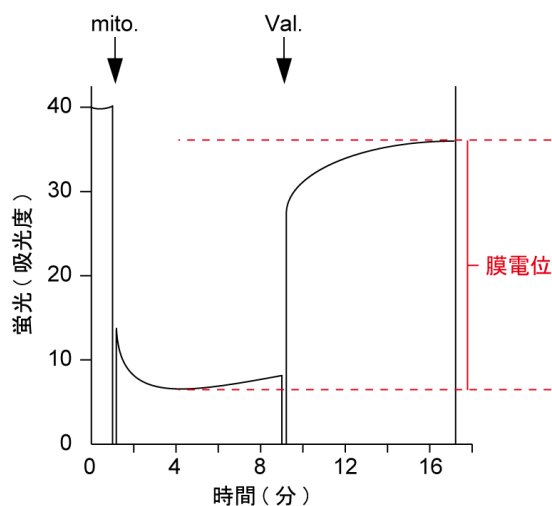


図 13 膜電位測定の実例

膜電位測定の原理は、以下のとおりである。DiSC₃(5)は蛍光指示薬であり、モノマーで蛍光を示し、ダイマーで無色となる。また、過分極している生体膜に蓄積する性質があり、ミトコンドリアを添加するとモノマーDiSC₃(5)は膜へ結合しダイマーを形成するため、蛍光が一定量低下する。そこに、バリノマイシンを添加するとマトリクス内にK⁺が流入し、膜電位が消失するためDiSC₃(5)はモノマーとして放出され、蛍光が回復する (図 13)。この蛍光の回復量は、膜電位に比例する。もし、膜電位を失っている場合は、この蛍光の回復がみられない。

6)-13 化学架橋産物の精製と同定

後述 (7)-6 相互作用因子同定の試み) の条件で, 化学架橋実験と同様の操作を行った。反応停止後, ソニケーション処理で細胞を破碎後, 100,000 rpm (TLA 100.2 ローター, Beckman), 30 分間, 4°C で遠心分離した。沈殿に 20 μ L の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で希釈した 2% SDS buffer を添加し, ピペッティング操作後, 5 分間, 95°C で処理した。180 μ L の base buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) を添加し, 15,000 rpm (TMA-4 ローター, TOMY), 5 分間, 4°C で遠心した。上清と 20 μ L 分の Ni NTA agarose (QIAGEN) を混ぜ, 5 分毎にタッピングして 30 分間, 氷上で反応させた。Ni NTA agarose を 100 μ L の base buffer で 2 回, 洗い込みながらカラム (Micro Bio-Spin[®] Chromatography Columns, BIO RAD) に移した。50 mM imidazole を含む 50 μ L の base buffer で 5 回洗浄後, 100 mM または 200 mM imidazole を含む base buffer でそれぞれ 2 回, 溶出した。溶出液 10 μ L に SDS sample buffer を添加し, 5 分間, 95°C で処理した。SDS-PAGE には, 12.5% の市販のゲル (Super SepTMAce, Wako) を用いた。泳動したゲルを銀染色し (Silver SNAP Stain for Mass Spectrometry SilverSNAP Stain Kit II, Thermo), 目的のバンドを質量分析した。質量分析には, 発生医学研究所の質量分析支援を利用した。

7) 実験結果

7)-1 Bcs1 の機能に必要な領域の探索と各複合体形成の検討

酵母は、呼吸鎖が機能していなくてもグルコースを炭素源とした発酵培地 (SD-Ura) 上で増殖可能である。一方、乳酸を炭素源とする非発酵培地 (S.Lactate-Ura) ではミトコンドリアの呼吸活性が増殖に必須である。このため、*bcs1* 欠失株 ($\Delta bcs1$) は発酵培地で増殖を示すが、非発酵培地では増殖不全を示す (図 14)。この性質を利用し、 $\Delta bcs1$ に様々な変異型 Bcs1 を発現させ、非発酵培地での増殖不全を回復できるか否かを調べることで、どの領域や残基が Bcs1 の機能に必須であるかを検討した (呼吸活性実験)。

親株として使用している野生株 (W303-1A 株, WT) は栄養要求性株であり、アデニン (*ade2-1*)、ヒスチジン (*his3-1,15*)、ロイシン (*leu2-3,112*)、トリプトファン (*trp1-1*) 及びウラシル (*ura3-1*) を合成するためのタンパク質を欠失していることから、これらの遺伝子を選択マーカーとして使用することができる。本実験では、野生型 Bcs1 と変異型 Bcs1 の遺伝子を、*URA3* を持ったベクターに組み込み、様々な Bcs1 発現プラスミドを作製した。作製したプラスミドを $\Delta bcs1$ に導入し、ウラシルを除いた発酵培地を用いて形質転換体を得た。これを、ウラシルを除いた非発酵培地で培養し、増殖を評価した。

Bcs1 は 3 つの領域で構成されており、1-44 番目の残基が膜間部領域、45-68 番目の残基が膜貫通領域、69-456 番目の残基がマトリクス領域である (図 6) (Fölsch *et al.*, 1996)。さらに、マトリクス領域は 69-126 番目の残基がミトコンドリア局在化シグナル領域、219-456 番目の残基が AAA ドメインとして報告されている (図 6) (Fölsch *et al.*, 1996)。膜貫通領域以降のアミノ酸配列は、様々な生物種間で高い相同性を示す。一方、膜間部にある N 末端領域は生物種によって長さが異なり (図 6)、Bcs1 の機能に関わる報告もなかったことから、研究開始当初は特に重要な領域ではないと考えていた。また、一般的な膜タンパク質は膜貫通領域があると精製が困難であることから、もし膜貫通領域を含む N 末端領域が Bcs1 機能に必須でなければ、精製しやすい改変 Bcs1 を作製できると考えた。そこで、野生型 Bcs1 を発現する株 (Bcs1_{WT})、N 末端 2-40 番目の残基欠失株 ($\Delta 2-40$) 及び 2-65 番目の残基欠失株 ($\Delta 2-65$) を作製したところ、呼吸活性実験において、いずれの株も発酵培地で増殖を示したが、 $\Delta 2-40$ と $\Delta 2-65$ は非発酵培地で増殖不全を示した (図 14)。

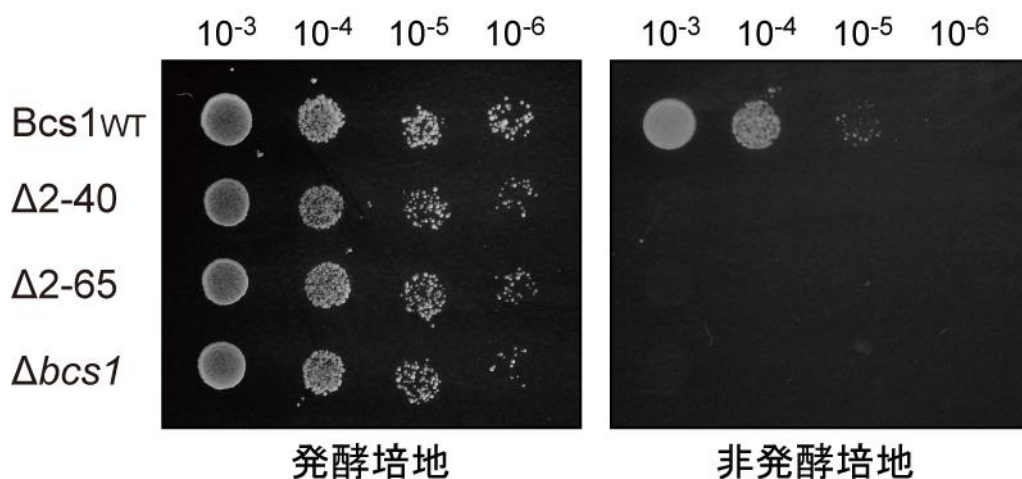


図 14 呼吸活性実験

1.0×10^3 OD₆₀₀ unit/5 μ L になるよう滅菌蒸留水で希釈した培養液を 1.0×10^6 OD₆₀₀ unit/5 μ L まで 10 倍ずつ段階希釈し、5 μ L ずつ寒天培地上にスポットした。培養は 30°C で 2-4 日間行った。

次に、whole cell lysate と単離したミトコンドリア lysate を用いて SDS-PAGE し、Western blotting で Bcs1 を検出した結果、 $\Delta 2-40$ は whole cell lysate とミトコンドリア lysate のいずれにおいても検出されたが、 $\Delta 2-65$ は whole cell lysate でのみ検出された (図 15)。この結果から、ミトコンドリアへの局在化には膜貫通領域が必要であることが示唆された。

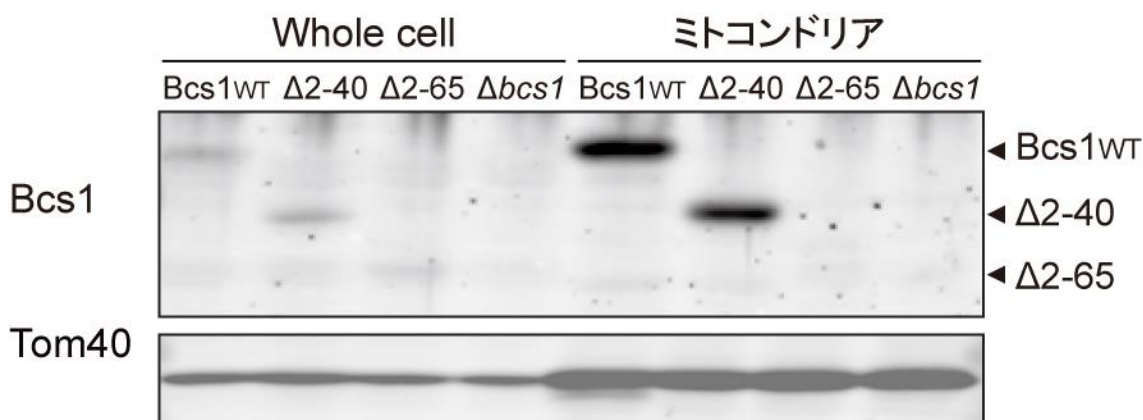


図 15 各株における各タンパク質の発現

Bcs1_{WT}, $\Delta 2-40$, $\Delta 2-65$ 及び $\Delta bcs1$ の Whole cell lysate とミトコンドリア lysate を 12% アクリルアミドゲルで SDS-PAGE した。検出には、(上) 抗 Bcs1 抗体と (下) 抗 Tom40 抗体を用いた。

次に、Bcs1 自身の複合体形成と成熟複合体Ⅲ形成への影響を検討するため、digitonin で可溶化したミトコンドリアについて複合体の検出に有用である Blue Native-PAGE を行った。検出にはそれぞれ、抗 Bcs1 抗体と抗 Cyt *c*₁ 抗体を用いた。これまでの報告で、Blue Native-PAGE において Bcs1_{WT} では「成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×2」, 「成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×1」及び「成熟複合体Ⅲ二量体」が検出され、 $\Delta bcs1$ では「未成熟複合体Ⅲ」とその二量体が検出されることが報告されている (図 5) (Conte *et al.*, 2011; Wagener *et al.*, 2011)。Bcs1_{WT}, $\Delta bcs1$ 及び $\Delta 2-40$ から単離したミトコンドリアを用いて検討したところ、Bcs1_{WT} と $\Delta 2-40$ では Bcs1 自身の複合体形成に影響はなかったが、 $\Delta bcs1$ と $\Delta 2-40$ からは未成熟複合体Ⅲが検出された (図 16, (A), (B))。これらの変異は、コントロールとして用いた外膜タンパク質 Tom40 複合体の形成には影響を及ぼさなかった (図 16, (C))。この結果から、N 末端 2-40 番目の残基は、Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合という Bcs1 の機能に必須であると考えられた。

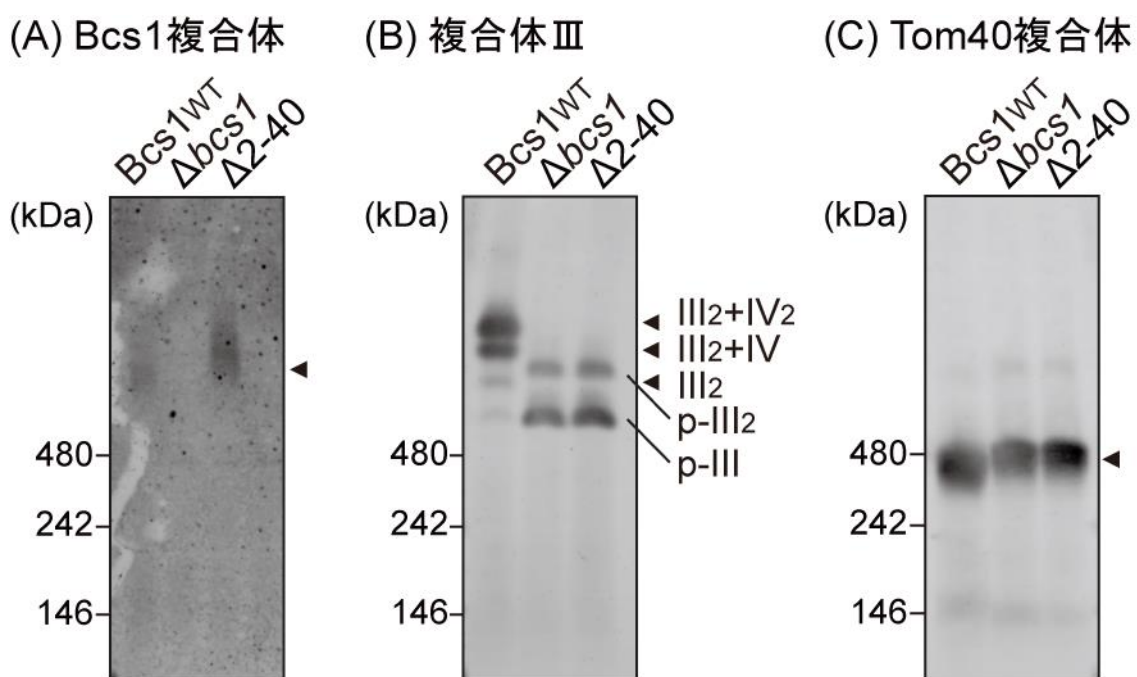


図 16 各株のミトコンドリアにおける複合体形成

1% digitonin buffer で溶出したミトコンドリア lysate を 3-12% グラジエントゲルで電気泳動した。各複合体の検出には、(A) 抗 Bcs1 抗体、(B) 抗 Cyt *c*₁ 抗体及び(C) 抗 Tom40 抗体を用いた。

III₂+IV₂: 成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×2, III₂+IV: 成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×1, III₂: 成熟複合体Ⅲ二量体, p-III₂: 未成熟複合体Ⅲ二量体, p-III: 未成熟複合体Ⅲ

次に、N末端のどの配列が Bcs1 の機能に最低限必須であることを明らかにするため、種々の部分欠失変異型 Bcs1 を発現する株を作製した。その結果、いずれの変異株も発酵培地で増殖を示した (図 17)。これに対し、非発酵培地では 2-30 番目の残基、2-10 番目の残基、11-20 番目の残基、21-30 番目の残基、31-34 番目の残基、35-37 番目の残基及び 41-44 番目の残基をそれぞれ欠失した Bcs1 ($\Delta 2-30$, $\Delta 2-10$, $\Delta 11-20$, $\Delta 21-30$, $\Delta 31-34$, $\Delta 35-37$ 及び $\Delta 41-44$) を発現する株は増殖を示したが、31-40 番目の残基と 38-40 番目の残基を欠失した Bcs1 ($\Delta 31-40$ と $\Delta 38-40$) を発現する株は増殖不全を示した (図 17)。さらに、2-37 番目の残基を欠失した Bcs1 ($\Delta 2-37$) を発現する株と 2-38 番目の残基を欠失した Bcs1 ($\Delta 2-38$) を発現する株を作製したところ、 $\Delta 2-38$ のみ非発酵培地で増殖不全を示した (図 17)。この結果から、Bcs1 の機能には 38 番目の残基以降、特に 38-40 番目の残基が必須であることが明らかになった。

続いて、38-40 番目の残基の単独欠失株を作製したところ、特に 38 番目の残基を単独欠失した Bcs1 を発現する株で最も増殖への影響が見られた (図 18)。



図 17 呼吸活性実験

(A) 発酵培地, (B) 非発酵培地

それぞれの変異体の欠失領域を右側に模式的に示した。

黒: 非発酵培地上で増殖する株 (呼吸活性有り)

赤: 非発酵培地上で増殖不全を示す株 (呼吸活性無し)

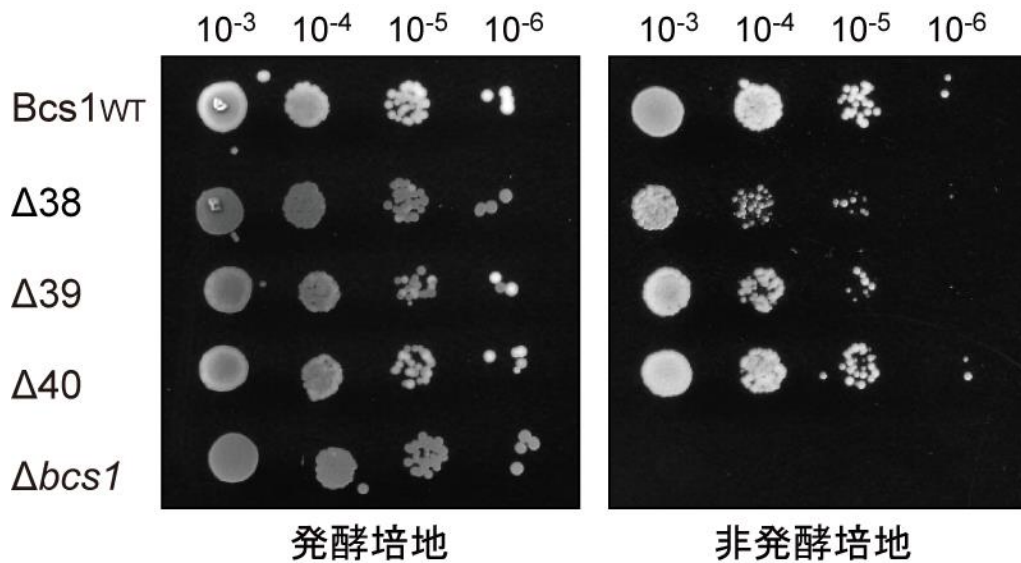


図 18 呼吸活性実験

1.0×10^{-3} OD₆₀₀ unit/5 μ L になるよう滅菌蒸留水で希釈した培養液を 1.0×10^{-6} OD₆₀₀ unit/5 μ L まで 10 倍ずつ段階希釈し、3 μ L ずつ寒天培地上にスポットした。培養は 30°C で 2-4 日間行った。

そこで、Bcs1 の機能に必要な 38 番目の残基のアミノ酸の性質を明らかにするため、この残基を様々なアミノ酸に置換した変異型 Bcs1 を発現する株を作製した。その結果、いずれの変異株においても発酵培地上で増殖を示したが、非発酵培地で Bcs1_{WT} と同様の増殖を示したのは、バリン(V)、フェニルアラニン(F)、システイン(C)、メチオニン(M)、アラニン(A)、グリシン(G)、トレオニン(T)、セリン(S)、トリプトファン(W)及びチロシン(Y)に置換した変異株であった(図 19)。一方、プロリン(P)とヒスチジン(H)置換体は、若干の増殖低下がみられた(図 19)。さらに、グルタミン酸(E)、グルタミン(Q)、アスパラギン(N)、及びアルギニン(R)置換体は著しい増殖低下を示し、アスパラギン酸(D)とリシン(K)置換体は完全な増殖不全を示した(図 19)。これはアミノ酸の疎水性を示す hydrophathy index と相関しており、疎水性が低くなるほど増殖不全を示す傾向にあることが分かった(表 11)。つまり、Bcs1 の機能には、38 番目の残基がある程度の疎水性を持っていることが重要であると考えられた。

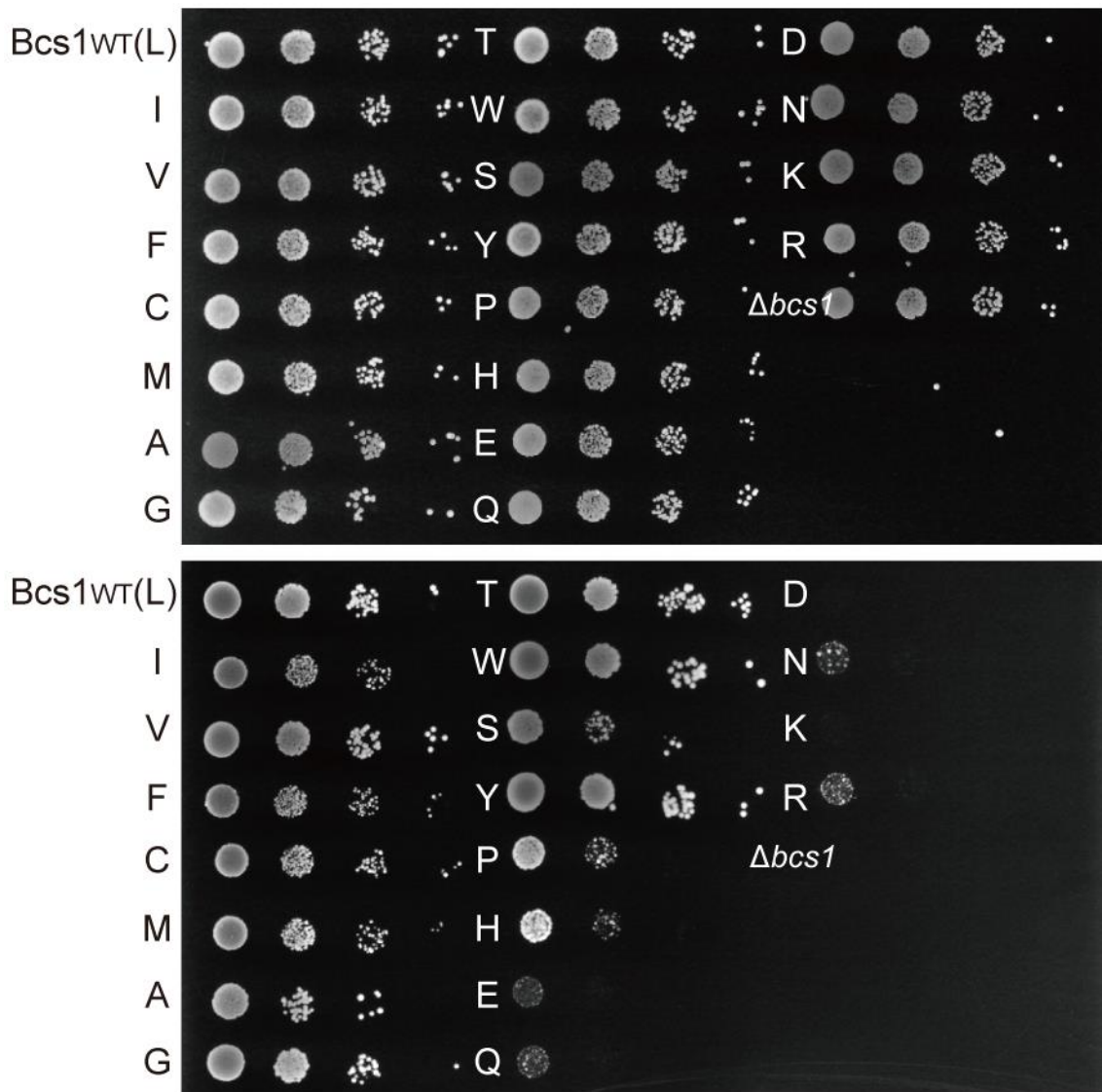


図 19 呼吸活性実験

(上) 発酵培地, (下) 非発酵培地

1.0×10^{-3} OD₆₀₀ unit/5 μ L になるよう滅菌蒸留水で希釈した培養液を 1.0×10^{-6} OD₆₀₀ unit/5 μ L まで 10 倍ずつ段階希釈し, 3 μ L ずつ寒天培地上にスポットした。培養は 30°C で 2-4 日間行った。

表 11 各アミノ酸の疎水性と非発酵培地上の増殖

アミノ酸		疎水性	増殖
イソロイシン	I	4.5	+++
バリン	V	4.2	++
ロイシン	L	3.8	+++
フェニルアラニン	F	2.8	++
システイン	C	2.5	++
メチオニン	M	1.9	++
アラニン	A	1.8	+++
グリシン	G	-0.4	+++
トレオニン	T	-0.7	+++
セリン	S	-0.8	++
トリプトファン	W	-0.9	+++
チロシン	Y	-1.3	+++
プロリン	P	-1.6	+
ヒスチジン	H	-3.2	+
グルタミン酸	E	-3.5	+/-
グルタミン	Q	-3.5	+/-
アスパラギン酸	D	-3.5	-
アスパラギン	N	-3.5	+/-
リシン	K	-3.9	-
アルギニン	R	-4.5	+/-

疎水性の指標は, **Hydropathy index** を用いた (Kyte and Doolittle, 1982)。増殖の指標として野生型 (Bcs1_{WT}(L)) の増殖に対して, 同等: +++, 若干低下: ++, 低下: +, 著しい低下: +/-, 増殖不全: -とする。

次に、38番目の残基近傍の構造的特徴を明らかにするため、二次構造を予測した。その結果、36-47番目の残基において α -helix構造を形成していることが予測された(図20)。この α -helix構造がBcs1の機能に重要であるかを検討するため、この領域にプロリンを導入し、 α -helix構造を破壊したところ、非発酵培地で増殖不全を示した(図21)。この結果から、この α -helix構造がBcs1の機能に必須であると考えられた。

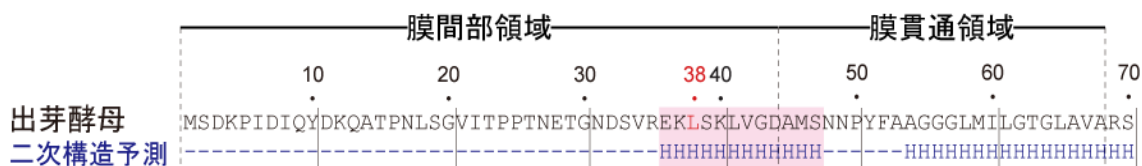


図 20 Bcs1 の二次構造予測

膜間部領域近傍で α -helixを形成している領域を桃色で示した。

H: α -helix, E: β -sheet (YASPIN プログラム; <http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>)

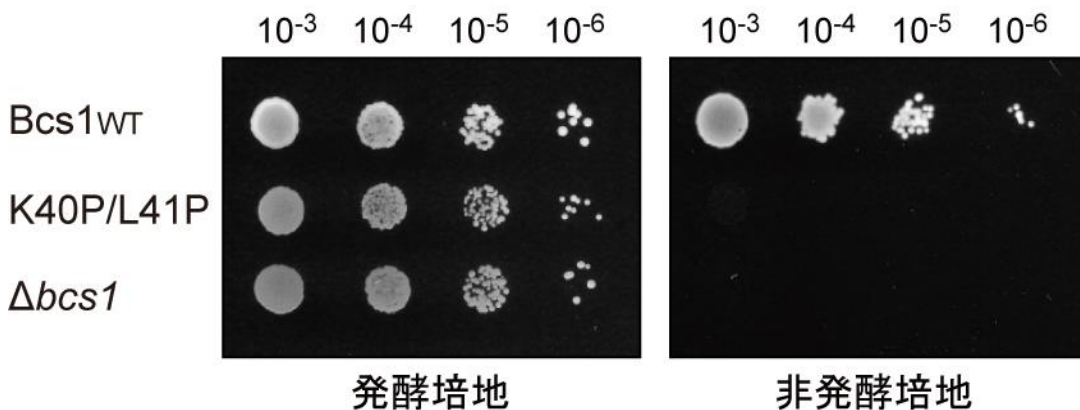


図 21 呼吸活性実験

1.0×10^{-3} OD_{600 unit}/5 μ L になるよう滅菌蒸留水で希釈した培養液を 1.0×10^{-6} OD_{600 unit}/5 μ L まで 10 倍ずつ段階希釈し、5 μ L ずつ寒天培地上にスポットした。培養は 30°C で 2-4 日間行った。

7)-2 抗 Rip1 抗体の特異性の確認

Rip1 は複合体Ⅲのサブユニットであり、Bcs1 の機能を解析する上で重要なタンパク質である。Rip1 の動態観察を行うため、抗 Rip1 抗体を作製した。Rip1 は生合成過程でプロセッシングを受け、成熟 Rip1 は 33 番目の残基から C 末端残基部分である。そこで、その部分を発現するプラスミドを作製した。ベクタープラスミドは、発現タンパク質に His-tag を付加する pET15b を用いた。タンパク質の発現は大腸菌で行い、タンパク質の精製には Ni NTA agarose を用い、imidazole を含む buffer で溶出した。これを抗原として抗体作製受託サービス (MBL) に依頼し、ウサギ抗体を作製した。

作製した抗 Rip1 抗体は、Rip1 抗原、Bcs1_{WT} と Rip1 欠失酵母株 ($\Delta rip1$) の whole cell lysate を用いて特異性を確認した。二次抗体には、抗ウサギ HRP 抗体を用いた。野生型 Rip1 の予測される分子量は約 23.4 kDa であり、Rip1 抗原 (His-tag が付加しているため、野生型 Rip1 のサイズより上に検出される) (図 22, *) と Bcs1_{WT} で検出されたが、 $\Delta rip1$ では検出されなかった (図 22, 赤矢尻)。この結果から、本研究で作製した抗 Rip1 抗体は実験に使用できることが確認できた。

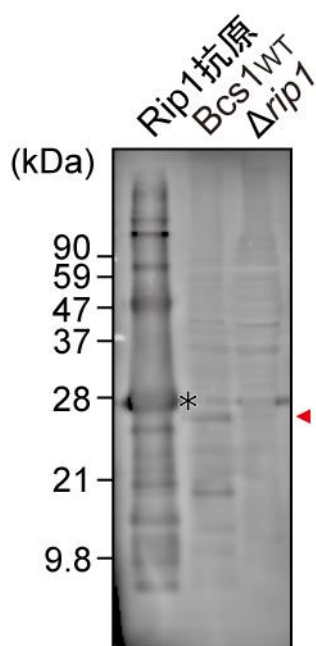


図 22 抗 Rip1 抗体確認

*: Rip1 抗原, 赤矢尻: Rip1

7)-3 N 末端変異株における各複合体形成の検討

呼吸活性実験の結果、38番目の残基が *Bcs1* の機能に重要であることが示唆された。そこで、*Bcs1* 複合体と成熟複合体Ⅲの複合体形成への影響を検討するため、38番目の残基がロイシンである野生型 *Bcs1* (*Bcs1*_{WT})、アラニン、アスパラギン酸またはアスパラギンに置換した変異型 *Bcs1* を発現する株 (L38A, L38D 及び L38N) と $\Delta bcs1$ から単離したミトコンドリアを digitonin で可溶化し、Blue Native-PAGE を行った。また、SDS-PAGE で各タンパク質の発現を観察した。検討した変異型はそれぞれ非発酵培地上において、L38A は増殖、L38D と L38N は増殖不全を示す変異である。

抗 *Bcs1* 抗体で検出した結果、いずれの変異型 *Bcs1* においても、ほぼ同じサイズの複合体が検出され、発現も *Bcs1*_{WT} と同等であった (図 23, (A))。このことから、N 末端の変異は、*Bcs1* 複合体の形成や *Bcs1* タンパク質の発現には、ほぼ影響を与えないと考えられた。

抗 Cyt *c*₁ 抗体 (複合体Ⅲ) で検出した結果、*Bcs1*_{WT} と L38A では「成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×2」、「成熟複合体Ⅲ二量体+複合体Ⅳ×1」及び「成熟複合体Ⅲ二量体」と考えられる3種類の複合体が検出された (図 23, (B)上)。これに対し、非発酵培地で増殖不全を示す L38D, L38N 及び $\Delta bcs1$ では、「未成熟複合体Ⅲ」とその二量体が主に観察された。いずれの変異型 *Bcs1* でも、Cyt *c*₁ 発現は *Bcs1*_{WT} と同程度であった (図 23, (B)下)。

さらに、抗 Rip1 抗体で検出した結果、*Bcs1*_{WT} と L38A で抗 Cyt *c*₁ 抗体で観察された3つのバンドと同じサイズの複合体が検出されたが、L38D, L38N 及び $\Delta bcs1$ ではバンドは検出されなかった (図 23, (C)上)。SDS-PAGE で Rip1 を検出したところ、複合体を形成していない L38D, L38N 及び $\Delta bcs1$ では *Bcs1*_{WT} と比較して Rip1 検出量の減少がみられたものの、検出には十分量発現していることが分かった (図 23, (C)下)。したがって、非発酵培地上で増殖不全を示す L38D と L38N は、Rip1 を未成熟複合体Ⅲに会合することができないということが明らかとなった。

ミトコンドリア外膜タンパク質である Tom40 をコントロールとして用いた。Tom40 の複合体形成と発現は、全ての *Bcs1* 変異株において不変であった (図 23, (D))。

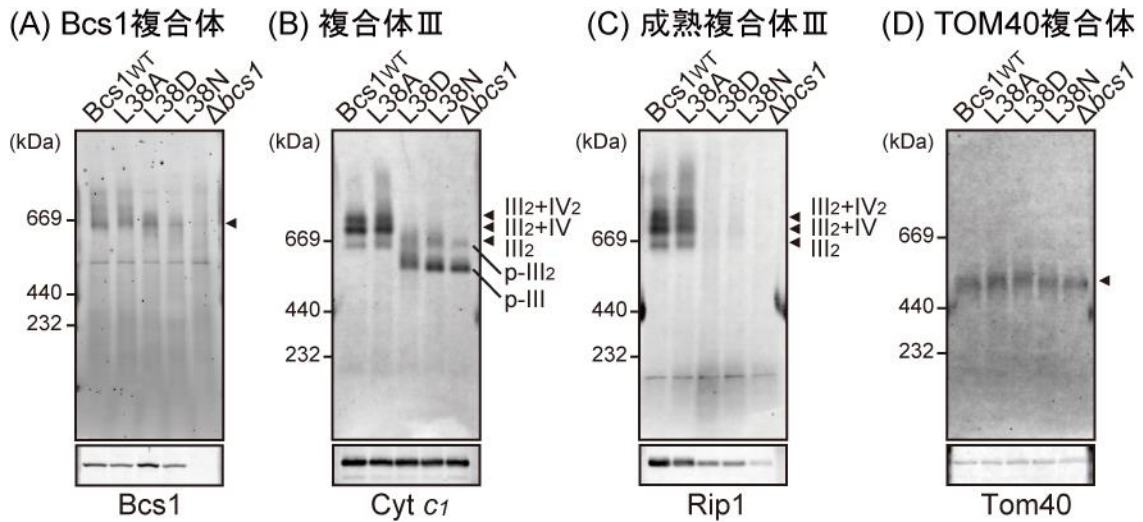


図 23 各株のミトコンドリアにおける複合体形成とタンパク質発現

(上) Blue Native-PAGE, (下) SDS-PAGE

Blue Native-PAGE では、1% digitonin buffer で溶出したミトコンドリア lysate を 3-12% または 4-16% グラジエントゲルで電気泳動した。SDS-PAGE では、全ミトコンドリアタンパク質を対象に 12% アクリルアミドゲルを用いた。検出には、最下部に記したタンパク質に対する抗体を用いた。

III₂+IV₂: 成熟複合体III 二量体+複合体IV×2, III₂+IV: 成熟複合体III 二量体+複合体IV×1, III₂: 成熟複合体III 二量体, p-III₂: 未成熟複合体III 二量体, p-III: 未成熟複合体III

7)-4 N 末端変異株における Rip1 のミトコンドリア内局在の検討

Blue Native-PAGE と SDS-PAGE の結果より、L38D と L38N には複合体Ⅲと未会合の Rip1 が存在していることが明らかになった。そこで、未会合 Rip1 のミトコンドリア内における局在を明らかにするため Proteinase K 消化実験を行った。Proteinase K 消化実験の原理は、以下の通りである。ミトコンドリアを digitonin 処理すると濃度依存的に外側から順々に膜が溶解するため、同時に Proteinase K で処理すると、digitonin で溶解された画分に存在するタンパク質は消化される。また、1% Triton X-100 (TX-100) で処理すると内膜まですべて溶解するため、同時に Proteinase K で処理すると、基本的に全てタンパク質が消化される。つまり、各タンパク質が消化される条件からミトコンドリア内の局在を知ることができる。各局在の指標として、膜間部タンパク質は Cytochrome *b*₂, マトリクスタンパク質は Tim44 を用いた。

抗 Rip1 抗体で検出した結果、Bcs1_{WT} と L38A では、Rip1 はいずれの処理においても消化されず、Proteinase K に対して耐性を示した (図 24, Rip1; Bcs1_{WT} と L38A; 矢尻)。これは、Bcs1 が正しく機能した場合、Rip1 は最終的に複合体Ⅲと複合体Ⅳの巨大複合体に組みこまれるため、消化され難くなっていると考えられた。これに対して、L38D と L38N では、Rip1 は低濃度の digitonin 存在下では消化されず、TX-100 処理したときにのみ消化された (図 24, Rip1; L38D と L38N; 矢尻)。この結果から、L38D と L38N の未会合 Rip1 はマトリクスもしくはマトリクス側の内膜に局在すると考えられた。

抗 Bcs1 抗体で検出した結果、Bcs1_{WT} と L38A, L38D と L38N とで異なる分解産物が観察された。Bcs1_{WT} と L38A では、Cytochrome *b*₂ が消化される 0.05% digitonin 処理でやや小さい分解産物が出現し (図 24, Bcs1; *), TX-100 処理で完全に消化される。これは、0.05% digitonin 処理で外膜が溶解し、膜間部に位置する N 末端領域の一部が Proteinase K により消化され、TX-100 処理でマトリクスに位置する AAA ドメインを含む C 末端領域まで消化されるためだと考えられる。これらの結果は、今まで報告されていた Bcs1 の配位と一致するものである。これに対して、L38D と L38N では、Bcs1_{WT} と L38A で検出された分解産物に加えて、さらに分子量の小さい分解産物 (図 24, Bcs1; L38D と L38N; **) が検出された。このことから、L38D と L38N の N 末端領域では、Bcs1_{WT} や L38A とは異なる部分で消化されていると考えられた。つまり、L38D と L38N の N 末端領域は、Bcs1_{WT} や L38A のそれとは異なる構造をとっている可能性が示唆された。

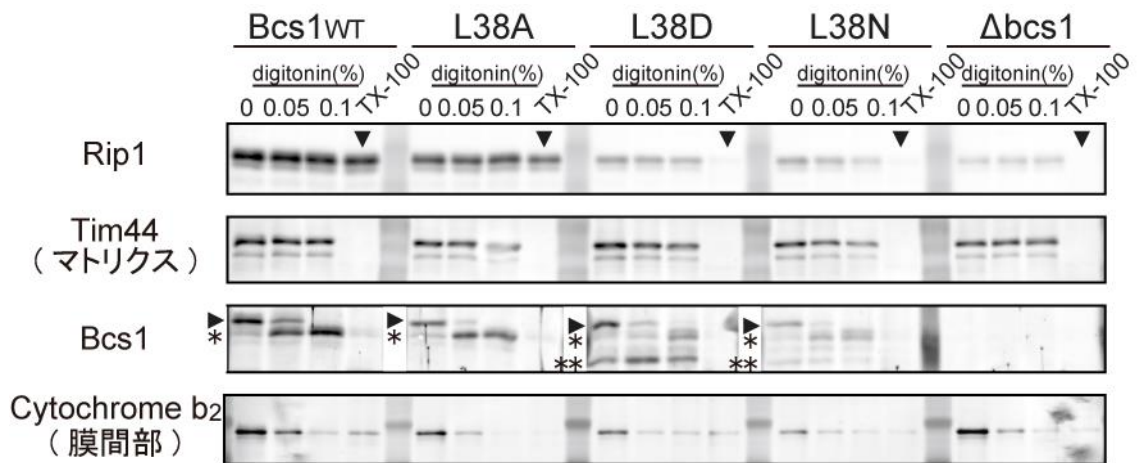


図 24 Proteinase K 消化実験

単離したミトコンドリアを 0, 0.05, 0.1% digitonin 及び 1% Triton X-100 で処理後、Proteinase K による消化を行った。Cytochrome b_2 と Tim44 はそれぞれ膜間部タンパク質とマトリクスタンパク質である。SDS-PAGE には 9% または 12% アクリルアミドゲルを用いた。

Rip1; 矢尻: Bcs1^{WT} と L38A は耐性を示し, L38D と L38N は消化された
 Bcs1; 矢尻: 全長タンパク質, 星印 (*と**) : 分解産物

7)-5 N 末端領域における相互作用因子と変異による影響の検討

Rip1 の局在を調べる過程で, Bcs1 の膜間部領域は L38D や L38N 変異により野生型とは異なる構造変化を引き起こしていることが予想され, この構造変化が Bcs1 の機能に影響を与えているのではないかと考えた。膜間部の N 末端領域で何らかの因子と相互作用している可能性を検討するため, 化学架橋実験を行った。化学架橋剤は, DTSSP を用いた。DTSSP は水溶性の二価性架橋剤であるため, 生体膜を通過することは非常に困難である。つまり, ミトコンドリア外膜は porin からなる透過孔があるため通過することができるが, 内膜は通過することができない (図 25, (A))。したがって, DTSSP による架橋反応は Bcs1 では膜間部の N 末端領域が架橋の作用点と予想される (図 25, (A))。Bcs1_{WT}, L38A, L38D 及び L38N から単離したミトコンドリアを DTSSP で処理後, SDS-PAGE と Western blotting を行い, 抗 Bcs1 抗体で検出した。SDS-PAGE を行う際は, 還元剤を含まない SDS sample buffer を使用した。これは, DTSSP が構造内にジスルフィド結合を持ち, 還元剤で容易に切断されるためである。また, 架橋産物以外の要因を取り除くため, DTSSP 処理と還元剤処理をしない Bcs1_{WT} をネガティブコントロールとした。その結果, 主に 3 つの架橋産物が得られた (図 25, (B))。特に赤で示す * は Bcs1_{WT} と L38A, L38D と L38N で移動度が異なることから, 相互作用様式が異なると考えられた (図 25, (B))。

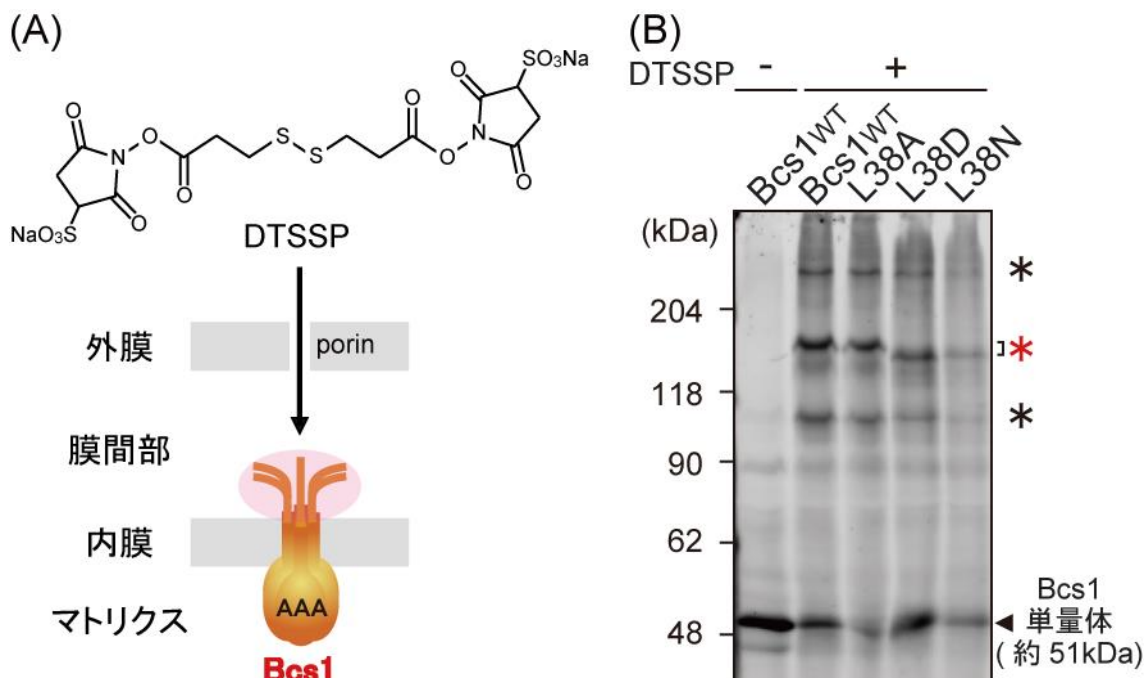


図 25 DTSSP 処理で生じた架橋産物

(A) 化学架橋剤 DTSSP の構造と予想作用点 (桃色)

(B) 化学架橋実験結果, 矢尻: Bcs1 モノマー, *: 架橋産物

7)-6 相互作用因子同定の試み

化学架橋実験の結果から、Bcs1 は N 末端で何らかの相互作用因子と結合している可能性が考えられた。この相互作用因子の同定は、Bcs1 の機能や Rip1 会合に関わるメカニズムを明らかにする上で重要である。そこで、相互作用因子を同定するべく、C 末端に His-tag を付加した野生型 Bcs1 を作製し、DTSSP で Bcs1 の N 末端と架橋される架橋産物の精製を行った。精製では効率を上げるため、His-tag 付 Bcs1 過剰発現株 (Bcs1o.e.) のミトコンドリアを使用した。架橋産物以外の要因を取り除くため、①DTSSP 処理 Bcs1o.e., ②DTSSP 処理 His-tag 付 Bcs1o.e.及び③DTSSP 非処理 His-tag 付 Bcs1o.e.の 3 つの条件に対して同じ精製処理を行った (表 12)。

表 12 相互作用因子精製の検討条件

検討条件	DTSSP 処理	His-tag
① Bcs1 過剰発現株	+	-
② His-tag 付 Bcs1 過剰発現株	+	+
③ His-tag 付 Bcs1 過剰発現株	-	+

精製では His-tag と結合する Ni NTA agarose を用いて His-tag 付 Bcs1 をトラップし、imidazole を含んだ buffer で溶出した。SDS-PAGE の際には、溶出サンプルに還元剤を含んだ SDS sample buffer を添加した。還元剤により DTSSP のジスルフィド結合が還元され、リンカー部位が切断されるため、② DTSSP 処理 His-tag 付 Bcs1o.e.で特異的に検出されるバンド (図 26, 矢尻) が Bcs1 との架橋産物であり、Bcs1 の相互作用因子候補と言える。図 26 の矢尻で示す②で観察されるバンドと、②で検出される非特異的なタンパク質を取り除くため同じ位置の③の部分を取り出し質量分析のサンプルとした。質量分析により②と③から得られたタンパク質を、表 13 に示した。②でのみ検出されるタンパク質のうち、ミトコンドリアに局在が知られているタンパク質を候補タンパク質として表 14 にまとめた。この候補のうち、分子量等を考慮すると Atm1 が第一候補として考えられた。Atm1 はミトコンドリア内膜に局在することが知られており、マトリクスからサイトゾルへ鉄硫黄クラスターを移動させるトランスポーター機能を有している (Kispal *et al.*, 1997)。

次に、Bcs1 と Atm1 が相互作用しているかを検討した。C 末端に c-myc-tag を付加した Atm1 を酵母で発現させ、ミトコンドリアを単離した。ミトコンドリアを DTSSP 処理した後、抗 c-myc-tag 抗体を反応させ、Sepharose A または G により免疫沈降した。これに Bcs1 が含まれるか、Western blotting で調べた。その結果、Bcs1 は検出されなかった。今後、Atm1 については tag を変更する等、他の方法で検討するとともに、質量分析で得られた Gut2, Nde1 及び Phb2 といったミトコンドリア内で局在や機能が知られ

ている (Nijtmans *et al.*, 2000; Grandier-Vazeille *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2001) 別の候補について同様の操作を行うことによって, Bcs1 の相互作用因子を同定することが必要である。

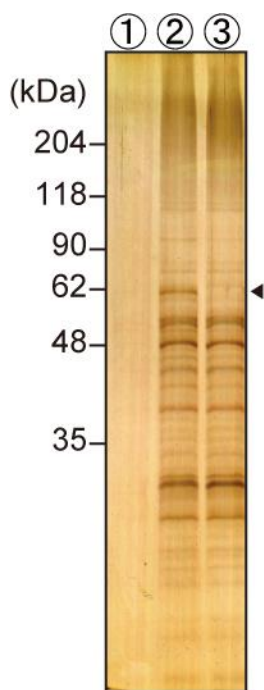


図 26 架橋産物の精製 (銀染色)

①-③は表 12 の条件と対応する。

表 13 ②と③より検出されたタンパク質

タンパク質名		分子量
②	③	(kDa)
Atm1	-	61.8
Atp1	Atp1	48.3
Cir2	Cir2	66.2
Dld1	Dld1	64.0
Dpl1	Dpl1	63.9
Gut2	-	50.1
-	Fmp25	47.2
Hsp60	Hsp60	60.7
Ilv3	Ilv3	62.8
Lcb1	Lcb1	62.2

Leu4	Leu4	68.4
Mcp2	Mcp2	50.8
-	Mep2	53.4
Mrh1	Mrh1	32.9
-	Mrs4	31.1
Nca2	Nca2	70.8
Nde1	-	48.0
Ost1	Ost1	54.2
Pcs60	Pcs60	49.0
Pdi1	-	47.6
-	Pet9	22.0
Phb2	-	34.4
Pma2	-	67.2
Put2	Put2	58.4
Sac1	Sac1	62.1
-	Sec12	39.7
Sdh1	Sdh1	64.1
Stt3	Stt3	81.5
-	Vac8	33.7
-	Vtc4	67.8
Yck2	Yck2	54.0
-	Yme1	53.5
hypothetical protein FOSTERSO_2400 (hypothetical protein)	-	11.8

表 14 候補タンパク質

タンパク質名	ミトコンドリア内局在	機能
Atm1	内膜	鉄硫黄クラスターの輸送
Gut2	内膜	グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
Nde1	内膜	キノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体 I）
Phb2	内膜	分子シャペロンなど様々な機能を有する

7)-7 膜電位形成能と複合体形成への影響

ミトコンドリアは、呼吸活性により膜電位を形成する。その呼吸活性は、呼吸鎖複合体の電子伝達で形成され、酵母であれば非発酵培地上の増殖で評価することができる。Bcs1 を欠失した酵母は非発酵培地で増殖不全を示すことから、呼吸活性不全が引き起こされていると推測され、この原因は Bcs1 の欠失による成熟複合体Ⅲ形成不全であると考えられる。しかし、Bcs1 の欠失は複合体Ⅲにだけ影響するのだろうか？そこで、Bcs1 が他の呼吸鎖複合体の機能や成熟にも関与するか否かを明らかにするため、膜電位の測定により、複合体 I と複合体 V (F₁F₀ATPase) の膜電位形成能を調べた (図 27)。検討には Bcs1_{WT}, 非発酵培地上で増殖不全を示す L38D と $\Delta bcs1$ のミトコンドリアを用いた。複合体 II はプロトンの放出に関わらず、複合体 IV は最終的に複合体Ⅲと巨大複合体を形成するため、今回の膜電位形成能の測定では活性を検討できない。

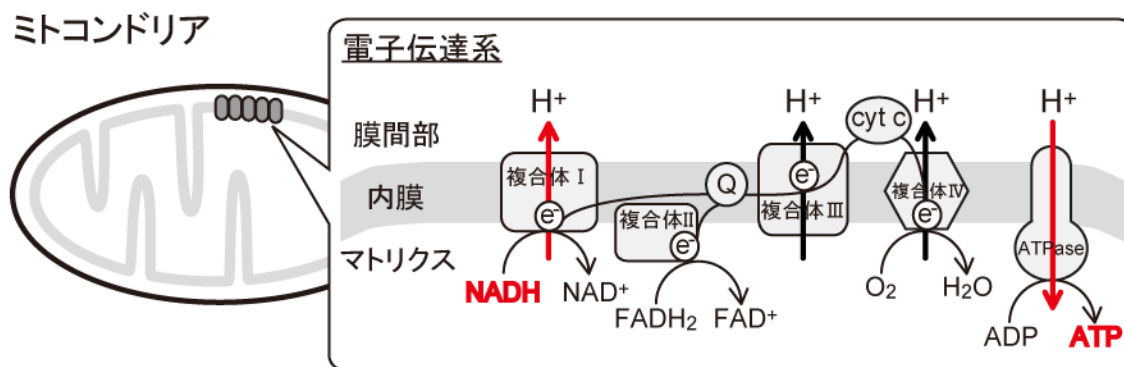


図 27 膜電位形成能測定原理

単離ミトコンドリアに NADH を添加すると、複合体 I の活性によりプロトンが汲み出され膜電位を形成する。つまり、NADH を添加すると複合体 I の膜電位形成能を測定できる。一方、ATP を添加すると、複合体 V (F₁F₀ATPase) の活性により膜電位を形成する (ATP 合成反応の逆反応)。つまり、ATP を添加すると複合体 V の膜電位形成能を測定できる。

まず、ミトコンドリアに NADH を添加し、複合体 I の膜電位形成能を測定したところ、Bcs1_{WT}, L38D 及び $\Delta bcs1$ のいずれの株においても膜電位が形成され、変異による差は見られなかった (図 28, +NADH)。このことから、Bcs1 は複合体 I の活性に影響を及ぼさないと考えられた。続いて、ミトコンドリアに ATP を添加し、複合体 V の膜電位形成能を測定したところ、Bcs1_{WT} のミトコンドリアで形成される膜電位に対して、L38D では若干低下し、 $\Delta bcs1$ では、ほぼ形成されなかった (図 28, +ATP)。このことから、Bcs1 は複合体 V の形成や機能に関わる可能性が考えられた。

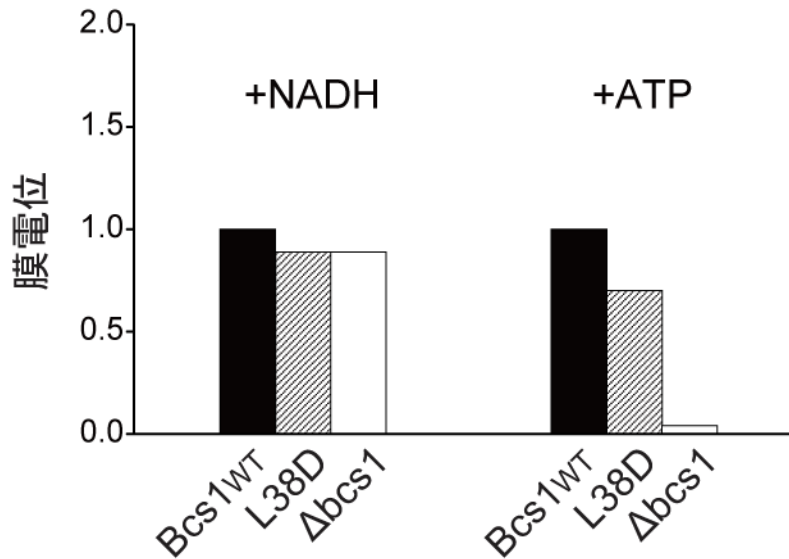


図 28 膜電位形成能

各ミトコンドリアの膜電位は，Bcs1_{WT}に対する相対値で示す。

+NADH: 複合体 I 活性，+ATP: 複合体 V (F₁F₀ ATPase) 活性

次に，複合体 V の複合体形成に対する影響を検討するため，ミトコンドリアを digitonin で可溶化し，Blue Native-PAGE を行った。Bcs1 複合体と複合体 III はこれまで検討した結果と同じく，Bcs1 複合体形成には Bcs1 の変異による影響がなく (図 29, (A))，複合体 III は Bcs1_{WT} では 3 つの各成熟段階の複合体 III (「成熟複合体 III 二量体+複合体 IV ×2」，「成熟複合体 III 二量体+複合体 IV ×1」，「成熟複合体 III 二量体」) が検出され，L38D と Δbcs1 では「未成熟複合体 III」とその二量体が検出された (図 29, (B))。複合体 V は最終的に二量体を形成するが (Everard-Gigot *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2009)，Bcs1_{WT}，L38D 及び Δbcs1 のいずれの株においても，違いは見られなかった (図 29, (C))。このことから，Bcs1 は複合体 V 形成には影響しないが，複合体 V の機能に影響すると考えられた。複合体 V の検出には，複合体 V サブユニットである F₁β に対する抗体を用いた。

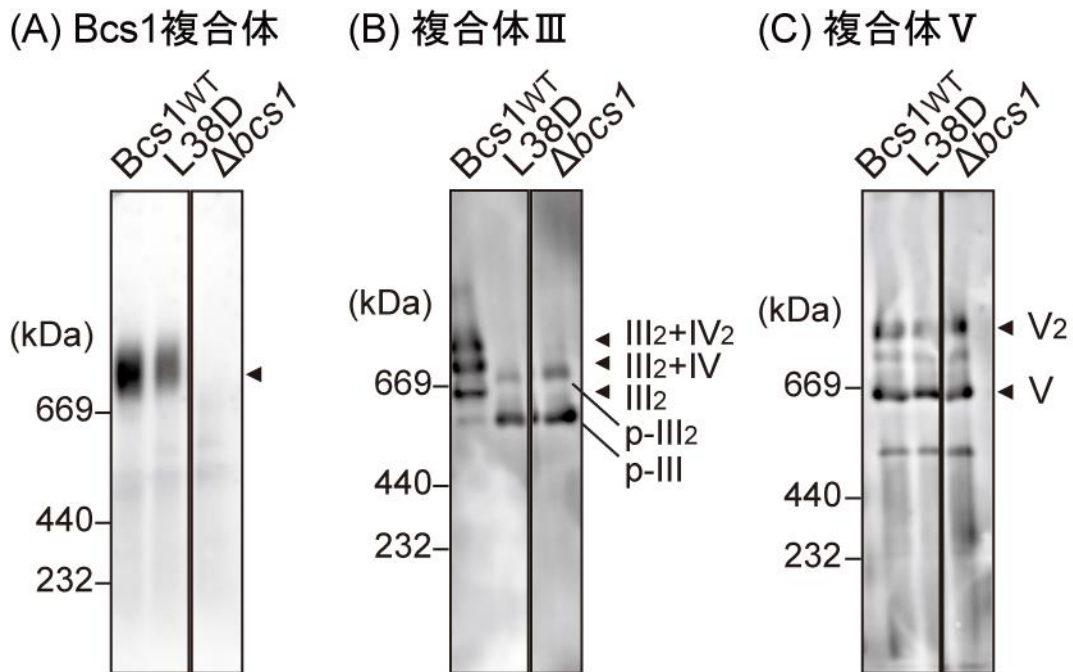


図 29 各株のミトコンドリアにおける複合体形成

1% digitonin buffer で溶出したミトコンドリア lysate を 3-12% グラジエントゲルで電気泳動した。各複合体の検出には、(A) 抗 Bcs1 抗体、(B) 抗 Cyt c_1 抗体及び(C) 抗 $F_1\beta$ 抗体を用いた。

III_2+IV_2 : 成熟複合体III二量体+複合体IV \times 2, III_2+IV : 成熟複合体III二量体+複合体IV \times 1, III_2 : 成熟複合体III二量体, p- III_2 : 未成熟複合体III二量体, p-III: 未成熟複合体III, V_2 : 複合体V二量体, V: 複合体V単量体

7)-8 Rip1 のミトコンドリア内挙動の解析

7)-8-1 Rip1 会合経路仮説

$\Delta bcs1$ では、野生株と比べて Rip1 の検出量が減少する (図 8) (Nobrega *et al.*, 1992)。このことから、 $\Delta bcs1$ の未会合 Rip1 はプロテアーゼにより分解されていると考えられる。ミトコンドリア内には、主に 4 つのタンパク質分解装置が存在する。内膜に局在する m-AAA プロテアーゼと i-AAA プロテアーゼ、マトリクスに局在する Lon と ClpXP である (図 30)。m-AAA と i-AAA は内膜に局在し、プロテアーゼドメインをそれぞれマトリクス側と膜間部側に持ち、膜内在性や膜間部に局在するタンパク質を主な基質としている (Leonhard *et al.*, 1996)。マトリクスに局在するタンパク質は、Lon や ClpXP によって分解される (Wagner *et al.*, 1994; Rottgers *et al.*, 2002)。特に Lon はミトコンドリアゲノムの保持やこれにコードされている呼吸鎖のサブユニットの品質管理に参与していることが分かっている (van Dyck *et al.*, 1998)。また、Lon プロテアーゼの基質候補として Rip1 が報告されていることから (Bayot *et al.*, 2010)、最も可能性の高いプロテアーゼである。しかし、Rip1 の会合経路によっては、他のプロテアーゼでも分解を受けられる可能性があると考えられる。

そこで、Bcs1 と各プロテアーゼの二重欠失株を作製し、Bcs1 の欠失によって引き起こる Rip1 の検出量の減少を解消する組合せを調べた。m-AAA または i-AAA によって解消する場合、未会合 Rip1 は内膜付近 (膜近傍のマトリクス、膜間部及び内膜) に局在していることになり、Bcs1 は「内膜または近傍に局在する Rip1」を未成熟複合体 III へ会合させると考えられる (図 30, ①)。これに対して、Lon または ClpXP によって解消する場合、未会合 Rip1 はマトリクスに局在していることになり、Bcs1 は「マトリクスに局在する Rip1」を未成熟複合体 III へ会合させると考えられる (図 30, ②)。

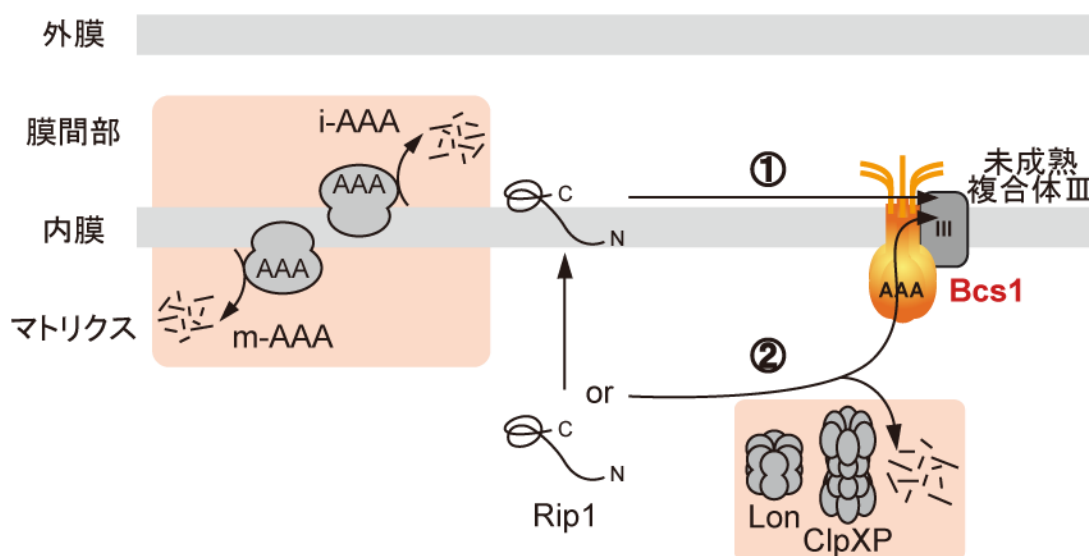


図 30 ミトコンドリア内プロテアーゼの局在と Rip1 会合経路仮説

7)-8-2 各変異株における Rip1 検出量の比較

未会合 Rip1 の分解に関わるプロテアーゼを明らかにするため、次の 8 種のプロテアーゼ欠失株を作製した (i-AAA プロテアーゼ単独欠失株 ($\Delta yme1$) と Bcs1 との二重欠失株 ($\Delta yme1/\Delta bcs1$), m-AAA プロテアーゼ単独欠失株 ($\Delta yta12$) と Bcs1 との二重欠失株 ($\Delta yta12/\Delta bcs1$), Lon プロテアーゼ単独欠失株 ($\Delta pim1$) と Bcs1 との二重欠失株 ($\Delta pim1/\Delta bcs1$), 及び ClpXP プロテアーゼ単独欠失株 ($\Delta mcx1$) と Bcs1 との二重欠失株 ($\Delta mcx1/\Delta bcs1$)) (表 15)。これに野生株 (WT) と $\Delta bcs1$ を加え、Western blotting を行い、Rip1 の量を比較した。

表 15 作製したプロテアーゼ欠失株

プロテアーゼ	局在	単独欠失株	Bcs1 との二重欠失株
i-AAA	内膜	$\Delta yme1$	$\Delta yme1/\Delta bcs1$
m-AAA	内膜	$\Delta yta12$	$\Delta yta12/\Delta bcs1$
Lon	マトリクス	$\Delta pim1$	$\Delta pim1/\Delta bcs1$
ClpXP	マトリクス	$\Delta mcx1$	$\Delta mcx1/\Delta bcs1$

抗 Rip1 抗体で検出した結果, Rip1 の検出量は WT に対して $\Delta yme1$, $\Delta yta12$ 及び $\Delta mcx1$ では、ほぼ変わらなかったが、 $\Delta pim1$ では減少がみられた (図 31, 表 16)。一方、 $\Delta bcs1$ に対して $\Delta yta12/\Delta bcs1$ と $\Delta mcx1/\Delta bcs1$ では Rip1 の検出量は、ほぼ変わらなかったが、 $\Delta yme1/\Delta bcs1$ では若干増加が見られ、特筆すべきは $\Delta pim1/\Delta bcs1$ では著しく増加しており、WT とほぼ変わらない量にまで回復していた (図 31, 表 16)。したがって、未会合 Rip1 は主に Lon プロテアーゼによって分解を受けている可能性が高いことが分かった。Rip1 検出量の WT に対する量比を、表 16 に示した。内部標準として外膜タンパク質である Tom40 を用いた。各株の Tom40 量は、ほぼ差が見られなかった。

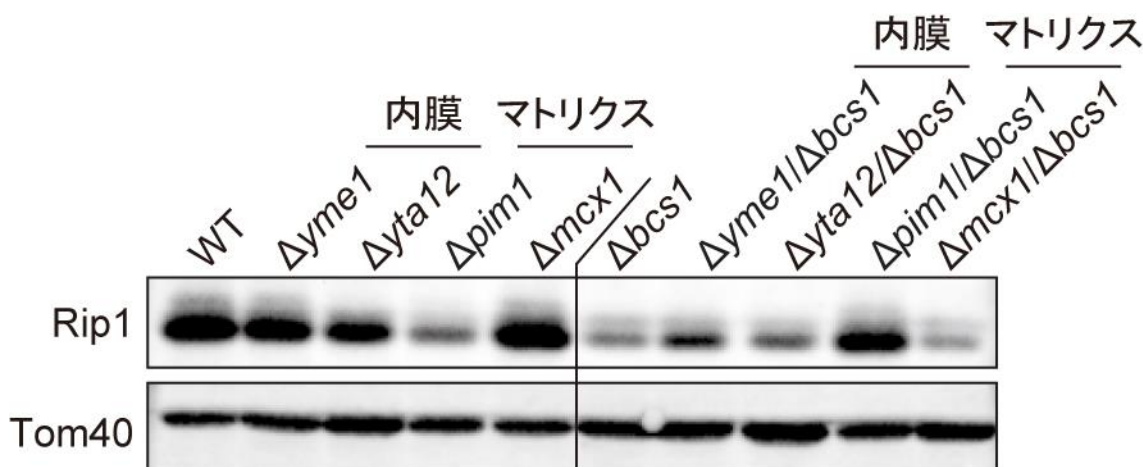


図 31 WT と各欠失株の Rip 量

表 16 Rip1 量の比較

株	WT	$\Delta yme1$	$\Delta yta12$	$\Delta pim1$	$\Delta mcx1$	$\Delta bcs1$	$\Delta yme1$ / $\Delta bcs1$	$\Delta yta12$ / $\Delta bcs1$	$\Delta pim1$ / $\Delta bcs1$	$\Delta mcx1$ / $\Delta bcs1$
比	1	0.7	0.5	0.3	1.1	0.2	0.4	0.2	0.7	0.1

WT の Rip1 量に対する相対値で示す

今回の検討で、 $\Delta pim1$ で Rip1 の検出量が WT と比較して減少するという結果が得られた。この結果は、Bayot らの報告にある $\Delta pim1$ で Rip1 が蓄積するという結果とは異なる (図 10) (Bayot *et al.*, 2010)。この違いの原因として、使用している親株が異なる等様々な理由が考えられた。まず、今回の結果が間違いなく Lon プロテアーゼを欠失させたことによるものであるかを確認するため、 $\Delta pim1$ と $\Delta pim1/\Delta bcs1$ に野生型 Pim1 を発現させた。その結果、それぞれ WT と $\Delta bcs1$ と同程度の Rip1 量を示した (図 32)。このことから、Rip1 検出量の増減は、確かに Lon プロテアーゼの欠失によるものであることが示された。 $\Delta pim1$ における Rip1 量減少の原因として、Lon プロテアーゼの欠失により、Rip1 の安定性に寄与するといわれている Mzm1 等に影響が出た可能性が考えられた。

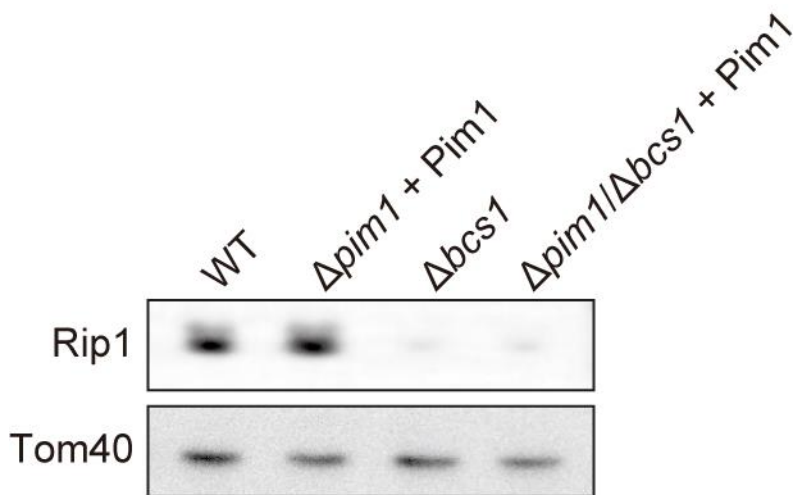


図 32 Pim1 発現による Rip1 量のリカバリー

7)-8-3 Rip1 のミトコンドリア内局在の検討

次に、WT, $\Delta bcs1$, $\Delta pim1$ 及び $\Delta pim1/\Delta bcs1$ のミトコンドリアを単離し、各欠失株での Rip1 の膜局在について検討した。ミトコンドリアを 10 mM MOPS で懸濁し、ソニケーション処理した後、超遠心を行うと不溶性画分（膜タンパク質や凝集体）と可溶性画分（マトリクスタンパク質）に分離することができる（図 33）。また、1% Triton X-100（TX-100）を添加して同様の操作を行うと、大部分の膜タンパク質は可溶化されるが、凝集体は可溶化されずに沈殿する（図 33）。この性質を利用し、WT, $\Delta bcs1$, $\Delta pim1$ 及び $\Delta pim1/\Delta bcs1$ の Rip1 のミトコンドリア内での局在について調べた。

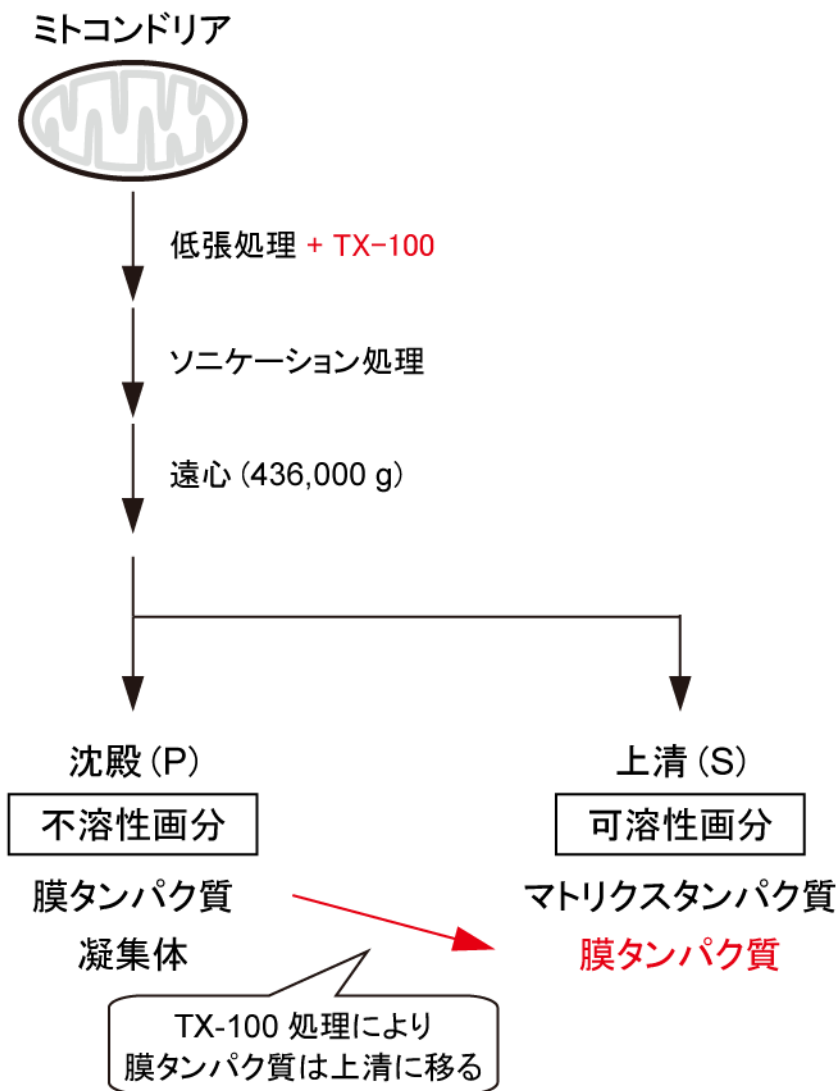


図 33 超遠心による不溶性画分と可溶性画分の分離

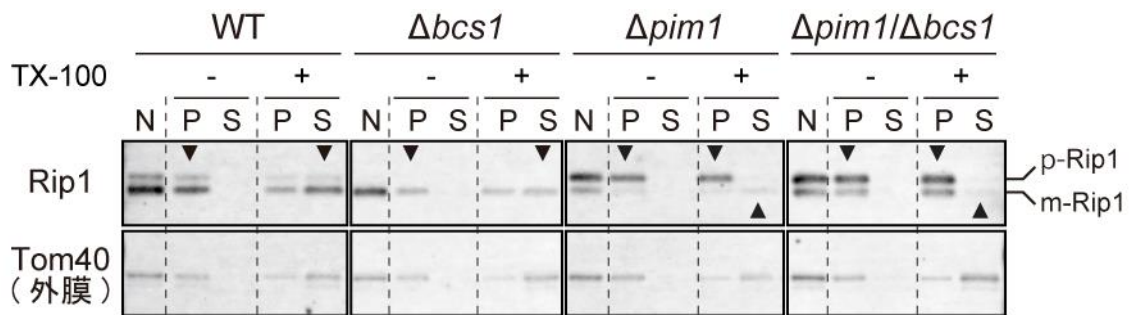


図 34 各株の Rip1 の膜局在

N: Non-treatment (無処理), P: Pellet (沈殿), S: Supernatant (上清), TX-100: 1% Triton X-100, p-Rip1: precursor Rip1 (Rip1 前駆体), m-Rip1: mature Rip1 (Rip1 成熟体)

Rip1 を検出すると、二つのサイズの異なるバンドが観察された。これらはそれぞれ、Rip1 前駆体 (p-Rip1) とプロセッシングされた後の Rip1 成熟体 (m-Rip1) であると考えられる (図 34) (Ljungdahl *et al.*, 1989; Priest and Hajduk, 1996)。

検討の結果、WT では Rip1 前駆体と Rip1 成熟体の両方のバンドが観察され、 $\Delta bcs1$ では Rip1 成熟体のみ観察された。WT と $\Delta bcs1$ の Rip1 は、TX-100 処理なしで沈殿、TX-100 処理ありで上清に検出された (図 34, Rip1; WT と $\Delta bcs1$; 矢尻)。このことから、WT と $\Delta bcs1$ の Rip1 は、Bcs1 非依存的に膜に局在していることが分かった。 $\Delta bcs1$ で Rip1 成熟体のみ観察される理由として以下の理由が考えられた。Rip1 成熟体は、Mzm1 により凝集や分解から保護されることが分かっている (Cui *et al.*, 2012)。つまり、Mzm1 に保護され分解を免れた Rip1 成熟体は何らかの機構により膜へ輸送されるが、Mzm1 の保護からあぶれた Rip1、特に Rip1 前駆体が優先的に分解されてしまうため、 $\Delta bcs1$ で Rip1 前駆体が観察されないと考えられた。

$\Delta pim1$ と $\Delta pim1/\Delta bcs1$ のミトコンドリアでは、Rip1 前駆体の割合が多いが Rip1 成熟体も観察された。Rip1 前駆体と成熟体は TX-100 処理なしで沈殿、TX-100 処理ありで Rip1 前駆体は沈殿、Rip1 成熟体は上清に検出される傾向にあった (図 34, Rip1; $\Delta pim1$ と $\Delta pim1/\Delta bcs1$; 矢尻)。このことから、 $\Delta pim1$ と $\Delta pim1/\Delta bcs1$ において Rip1 前駆体は凝集しており、Rip1 成熟体は膜に局在する傾向にあることが分かった。Rip1 前駆体が凝集している理由として、Lon プロテアーゼは Rip1 の成熟に、直接または間接的に関わると考えられた。

実験のコントロールとしてミトコンドリア外膜タンパク質 Tom40 を用いた。Tom40 は膜タンパク質であるため、TX-100 処理なしで沈殿に検出され、TX-100 処理ありで可溶化され上清に検出された (図 34, Tom40)。

7)-8-4 RT-PCR による Rip1 の mRNA 量の測定

次に、Bcs1 や Lon プロテアーゼの欠失による Rip1 検出量の増減が、転写段階での制御によるものかどうかを検討するため、定量 RT-PCR により mRNA の測定を行った。検討は、WT、 $\Delta bcs1$ 、 $\Delta pim1$ 及び $\Delta pim1/\Delta bcs1$ について行った。その結果、いずれの株においても Rip1 の mRNA 量にほぼ差は見られなかった (図 35)。以上の結果から、Bcs1 機能不全株において Rip1 検出量の減少には転写レベルの制御は関係なく、主に Lon プロテアーゼによる分解であることが分かった。

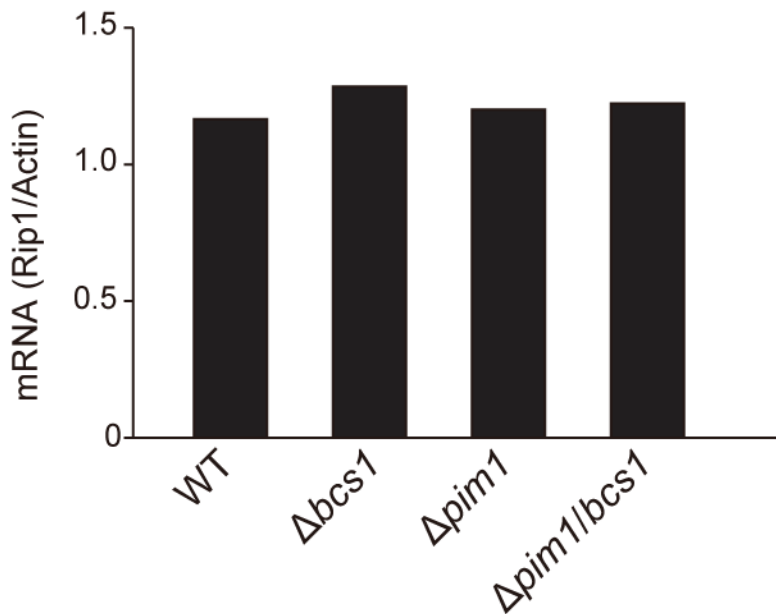


図 35 RT-PCR による Rip1 の mRNA 測定

縦軸は Actin の mRNA に対する Rip1 の mRNA の量比である。

実験開始当初は、図 30 の①や②で示したような Rip1 の会合経路をプロテアーゼの欠失により検討できると予想していたが、Lon プロテアーゼの欠失により Rip1 前駆体が凝集することや、Rip1 が Bcs1 非依存的にマトリクス側の内膜に局在することが明らかになったことから、Rip1 ミトコンドリア内の挙動は当初の仮説のような単純なものではないことが分かった。

8) 考察

8)-1 Bcs1 の膜間部 N 末端領域の構造的特徴

Bcs1 は、真核生物の中で高度に保存されている AAA タンパク質であり、酵母 Bcs1 とヒト BCS1L では同一性と相同性がそれぞれ 50% と 84% である。その保存性の高い配列は膜貫通領域以降の AAA ドメインを含むマトリクス側 (C 末端領域) であり、それに対して膜間部に位置する N 末端領域は生物種によって長さが異なり相同性も低い (図 7)。これまでマトリクスの AAA ドメインが機能に重要であることは報告されてきたが (Cruciat *et al.*, 1999), 膜間部の N 末端領域は Bcs1 の機能との関係について言及されてこなかった。ところが本研究において、膜間部の N 末端領域も Bcs1 の機能に必須であることが明らかになった。

呼吸活性実験の結果から、酵母 Bcs1 の膜間部の N 末端領域 44 残基のうち、Bcs1 の機能に必須な領域は、膜貫通領域の近傍の 3 残基 (38-40 番目の残基) であり、特に 38 番目の残基がある程度の疎水性を有している必要があるという特徴が明らかになった (図 17-19)。また、他生物種の配列と比較すると、この短い 3 残基の配列は、他の生物種においても比較的保存されていることが分かった (図 36)。二次構造予測から、この 38 番目の残基を含む N 末端領域は α -helix 構造を形成していることが予測された (図 20)。呼吸活性実験の結果、この N 末端領域の α -helix 構造が Bcs1 の機能に必要であることが分かった (図 21)。また、他の生物種の Bcs1 についても二次構造予測を行ったところ、 α -helix 構造は他の生物種の Bcs1 ホモログでも、ほぼ同じ位置に保存されていることが分かった (図 36)。多くの膜内在性タンパク質も膜貫通領域で α -helix 構造を形成しており、 α -helix 構造はチャンネルの形成やタンパク質間の相互作用にも関わる構造である。架橋実験の結果から、相互作用因子の存在が示唆されたことから、何らかの因子との相互作用にこの α -helix が必要である可能性も考えられる。それを明らかにするためにも、相互作用因子の同定は Bcs1 の機能解析に必須である。

Bcs1 の膜間部の N 末端領域は生物種によって長さが異なり、これまでその必要性が不明であったが、本研究から Bcs1 の機能に必須な残基や構造が、生物種間で保存されていることが明らかになった。この N 末端領域の長さは、高等生物になるほど短くなっていることから、進化の過程で洗練され必須な残基だけが残ったのではないかと考えられる。

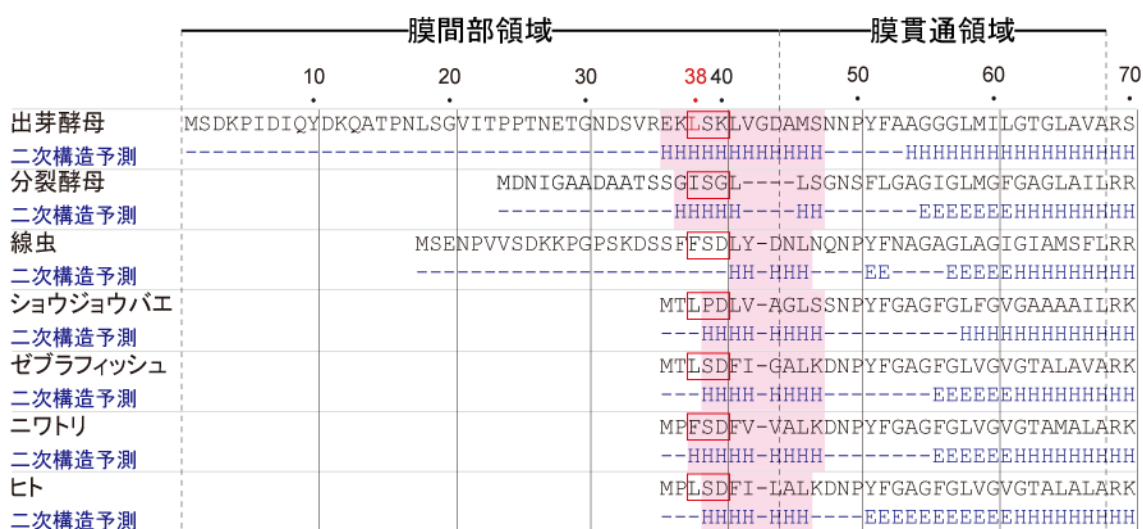


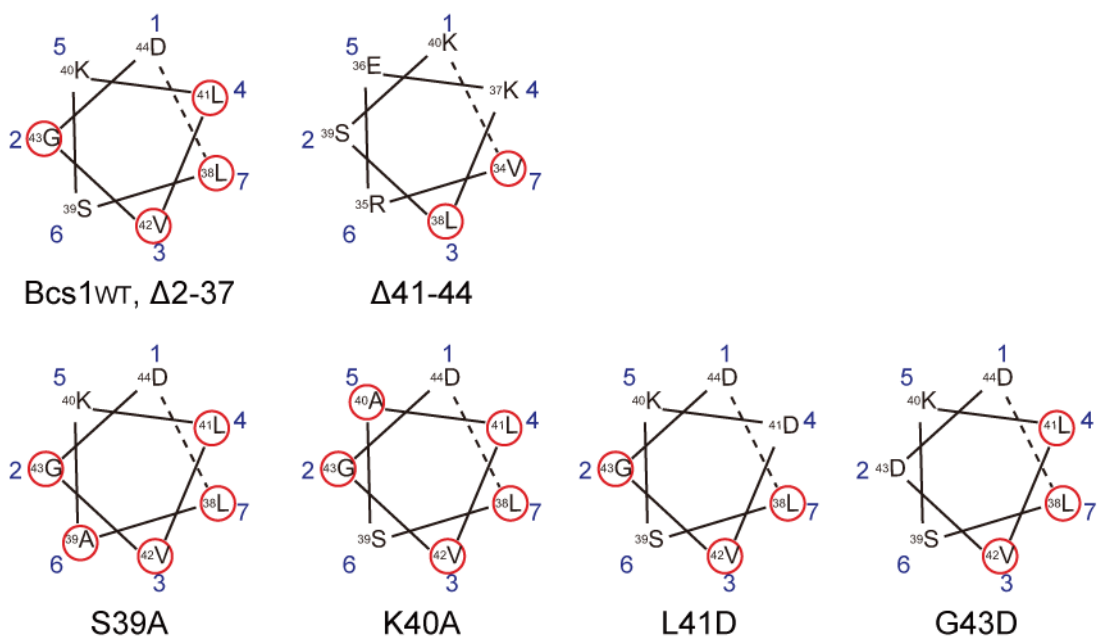
図 36 Bcs1 ホモログの N 末端側の配列と二次構造予測

酵母 Bcs1 の機能に必須だった配列を赤枠で示した。膜間部領域近傍で α -helix を形成している領域は桃色で示した。

H: α -helix, E: β -sheet (YASPIN プログラム; <http://www.ibi.vu.nl/programs/yaspinwww/>)

また、38 番目の残基以降の残基のうち、41-43 番目の残基をそれぞれアスパラギン酸に置換した Bcs1 (L41D, V42D 及び G43D) を作製したところ、呼吸活性実験において V42D が非発酵培地上で増殖不全を示した (未発表)。これらの結果をふまえ、非発酵培地上で増殖を示す (Bcs1 機能あり)、増殖不全を示す (Bcs1 機能欠損) 変異を整理したところ一定の法則を示すことが分かった。 α -helix を巻いたとき、膜貫通領域から数えて 3 番目と 7 番目の位置に疎水性アミノ酸が同時に配置すると増殖を示し、3 番目と 7 番目のどちらかに親水性アミノ酸が配置すると増殖不全を示す傾向にある (図 37)。このことから、Bcs1 の機能には、N 末端の α -helix が両親媒性 helix を形成している必要があると予想される。一般的にタンパク質表面の疎水性残基は、タンパク質同士の相互作用に働くことが多い。つまり、この疎水性アミノ酸の面が、化学架橋実験で示唆されている相互作用因子等といった未知の因子との結合に重要であると考えられる。すなわち、親水性アミノ酸に置換した場合、その法則が壊されることで疎水性アミノ酸の面が消失するため、相互作用因子との結合にも影響が出たのではないかと考えられる。

(A) 非発酵培地上で増殖を示す



(B) 非発酵培地上で増殖不全を示す

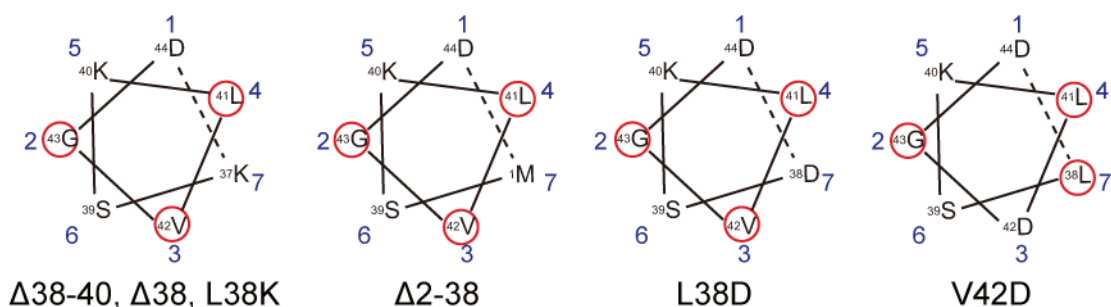


図 37 Bcs1 の機能と helix のアミノ酸配置の関係

(A) 非発酵培地上で増殖を示す変異型 Bcs1

(B) 非発酵培地上で増殖不全を示す変異型 Bcs1

青字: 膜貫通領域からの順番, 赤丸: 疎水性アミノ酸 (呼吸活性実験で増殖を示したチロシン以上の疎水性を持つアミノ酸 (表 11), Δ 2-38 の場合は 7 番目に当たるメチオニン末端のため親水性を示す)

8)-2 Bcs1 の膜間部 N 末端領域の役割

Blue Native-PAGE の結果から, 呼吸活性実験において非発酵培地上で増殖不全を示す N 末端領域欠失 Bcs1 変異株や 38 番目の残基を親水性の高い残基に置換した変異株で, 成熟複合体Ⅲ形成不全が引き起こされることが明らかになった (図 16, 図 23)。また,

Proteinase K 消化実験の結果から、未会合 Rip1 はマトリクスもしくはマトリクス側の内膜に局在していることが明らかになった (図 24)。つまり、Bcs1 の膜間部の N 末端領域は膜を隔てて、マトリクス側から内膜の未成熟複合体 III への Rip1 の会合に何らかの形で関与することが分かった。

Proteinase K 消化実験の結果から、成熟複合体 III 形成不全を示す変異型 Bcs1 の膜間部 N 末端領域は、野生型のものとは異なる構造をとっている可能性が示唆された (図 24)。また、化学架橋実験の結果から、これらの変異型 Bcs1 は野生型とは異なる相互作用因子との結合様式を示すことが分かった (図 25)。Bcs1 単量体の分子量が約 51kDa であることから、化学架橋実験で得られた架橋産物のサイズから Bcs1 二量体 (図 38, *¹), Bcs1 六量体 (図 38, *³) であると推測される。また、移動度の異なる架橋産物 (図 38, *²) は、野生型 Bcs1 と変異型 Bcs1 とで、異なる相互作用因子と結合している可能性も考えられるが、Proteinase K 消化実験の結果から、変異型 Bcs1 は野生型とは異なる構造をとっている可能性が示されたことを考慮すると、構造が異なることにより結合位置が変化し、結果として移動度に差が出たのではないかと考えられる。以上の結果から、Bcs1 が機能するために必要な膜間部 N 末端領域の構造や相互作用因子との結合様式は、38 番目の残基により規定されていると考えられる。

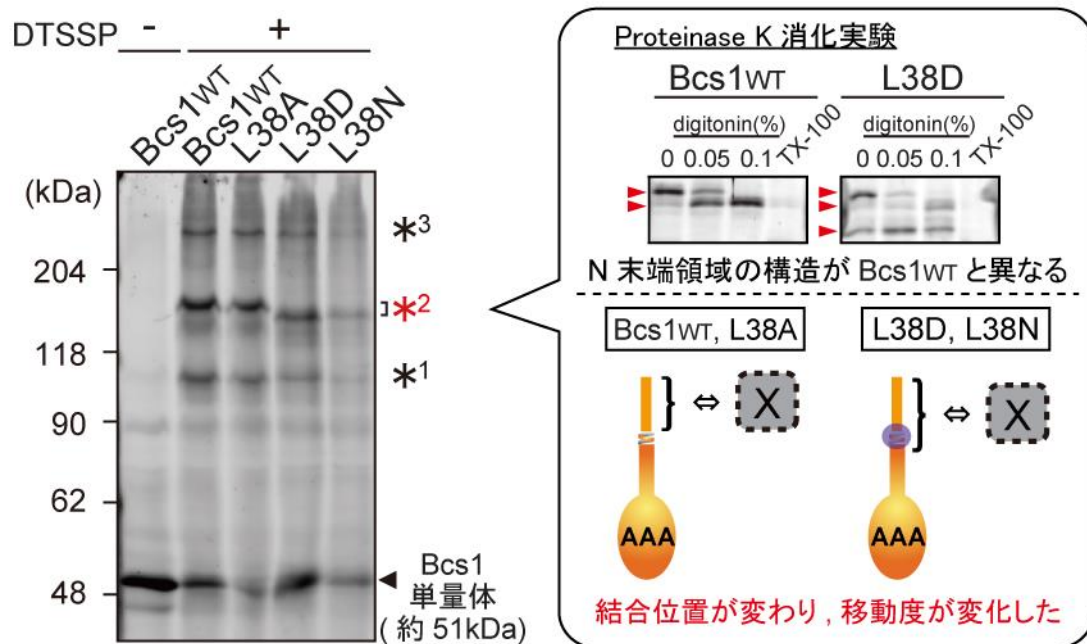


図 38 L38 変異による相互作用様式の変化

L38 を高親水性残基に置換すると野生型と異なる N 末端領域の構造を取り、相互作用様式が変化する。X: 未知の相互作用因子

8)-3 Bcs1 複合体の構成

Blue Native-PAGE の結果, Bcs1 複合体は約 660kDa として検出される (図 16, 図 23)。一般的な AAA タンパク質は六量体を形成していることから, Bcs1 複合体も六量体を形成していると考え、計算上の分子量は約 300 kDa (Bcs1 単量体: 約 51kDa) となり、実際検出される Bcs1 複合体よりも小さい。この分子量の差については、以下のように考えられる。Bcs1 複合体が Bcs1 のみで構成されている場合、Bcs1 複合体は六量体が二つ結合している、もしくは十二量体を形成している可能性が考えられる (図 39)。また、化学架橋実験で相互作用因子の存在が示唆されていることから、何らかの因子と複合体を形成していることが予想される (図 39)。また、このサイズは 38 番目の残基を親水性の高い残基に置換した変異型でも野生型と変わらないことから、N 末端領域の変異は Bcs1 自身の複合体形成に影響しないことが分かった。

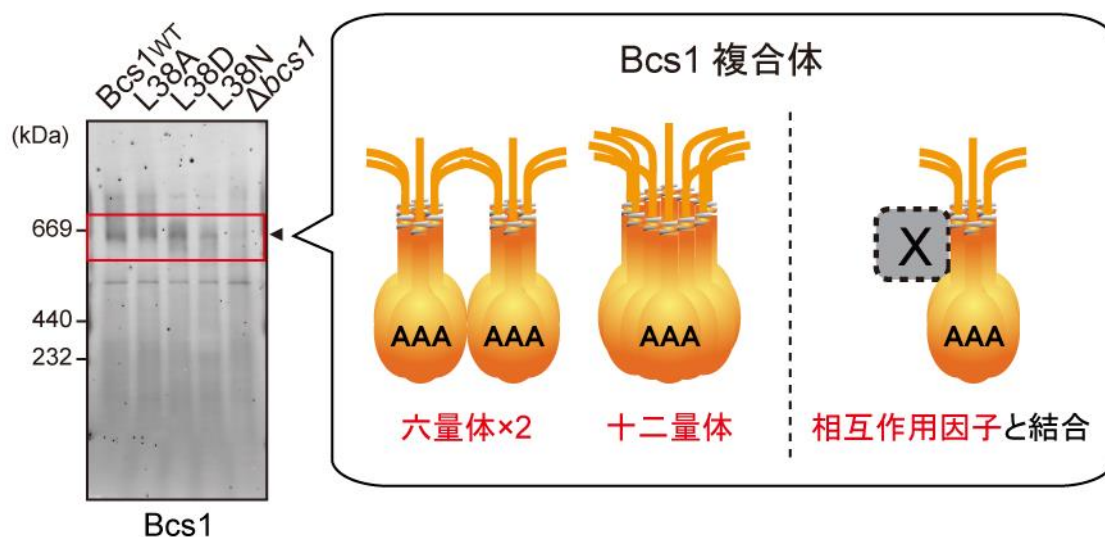


図 39 Bcs1 複合体の構成

Bcs1 複合体は分子量から、二つの Bcs1 六量体の結合体もしくは十二量体、または相互作用因子との結合体であると考えられる。X: 未知の相互作用因子

8)-4 ミトコンドリア内 Rip1 の成熟と局在

Bcs1 を欠失した株では、野生株と比べて Rip1 のタンパク質量が減少している (図 8) (Nobrega *et al.*, 1992)。そこで、Bcs1 とミトコンドリア内の各プロテアーゼとの二重欠失株を作製し、どのプロテアーゼとの二重欠失で Bcs1 における Rip1 検出量の減少が解消されるか検討したところ、マトリクスに局在する Lon プロテアーゼとの二重欠失株で解消されることが分かった (図 31, 表 16)。また、RT-PCR により mRNA 量を測定したところ、検討した株間でほぼ変わらない値を示した (図 35)。これらの結果から、Bcs1 の機能不全で生じた未会合 Rip1 は Lon プロテアーゼにより分解されるため、検出量が減少することが明らかになった。一方で、Lon プロテアーゼ単独欠失株で Rip1 量が減少した (図 31, 表 16)。この株のミトコンドリアを単離し、Rip1 の状態を検討したところ、野生型と比較して Rip1 前駆体の割合が増加しており、これは Lon プロテアーゼと Bcs1 の二重欠失株でも観察された (図 34)。この結果から、Lon プロテアーゼは直接または間接的に、Rip1 の成熟や安定性に関わると考えられる。マトリクスにおいて MPP (Mitochondrial processing peptidase) が Rip1 前駆体のプロセッシングに関わること (Isaya *et al.*, 1991) や、Mzm1 が Rip1 の成熟と凝集からの保護に関わること (Cui *et al.*, 2012) が分かっていることから、Lon プロテアーゼが MPP や Mzm1 等の Rip1 の成熟に関わる因子の発現や機能に関わっている可能性も考えられる。また、Lon プロテアーゼは、もともとミトコンドリアゲノムの保持やコードされている呼吸鎖のサブユニットの品質管理に関与していることが報告されていることから (van Dyck *et al.*, 1998)、この結果は妥当であると考えられる。

bcs1 欠失株の Rip1 の局在を検討したところ、Proteinase K 消化実験の結果から、*bcs1* 欠失株で Rip1 は、マトリクスもしくはマトリクス側の内膜に局在していることが分かった (図 24)。また、ミトコンドリアを不溶性画分、可溶性画分に分離したところ、野生株と *bcs1* 欠失株のいずれにおいても、Rip1 は不溶性画分に検出され、界面活性剤処理により可溶性画分で検出されるようになった (図 34)。このことから、Rip1 はマトリクス側の内膜に局在していると考えられる。これに加え、内膜プロテアーゼである i-AAA と Bcs1 の二重欠失株で、*bcs1* 欠失株と比較して Rip1 量が若干増加したことからも (図 31, 表 16)、Rip1 が内膜近傍に存在する可能性が高い。すなわち、Rip1 は Bcs1 非依存的にマトリクス側の内膜に局在している可能性が示唆される。

8)-5 Bcs1 の Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの組込みメカニズム仮説

Bcs1 は、Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合に必須であることが様々な研究により明らかになっている (Cruciat *et al.*, 1999; Nouet *et al.*, 2009; Conte *et al.*, 2011)。これまでの報告で、Rip1 は Bcs1 の C 末端領域と結合し、その放出には ATPase 活性が必要であることが分かっている (Wagener *et al.*, 2011)。Wagener らは、Bcs1 が輸送担体として Rip1 を内部に取り込み、未成熟複合体Ⅲへ輸送するとうい仮説を提唱している (Wagener *et al.*, 2011)。この説では、Bcs1 六量体の pore の直径は約 2.5-3 nm であり、フォールディングしたままの Rip1 が通過するには小さいため、Bcs1 が ATPase 活性を利用して pore を押し広げるように自身を変形させることで、Rip1 が通過しやすい形を取るのではないかとされている (Wagener *et al.*, 2011)。しかし、実際に Rip1 が Bcs1 内部を通過するかについては、明らかになっていない。

本研究により、Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの会合を助けるという Bcs1 の機能には、膜間部の膜貫通領域近傍にあたる N 末端領域の短い 3 残基の配列が必須であり、そのうちの最初の残基が Rip1 のマトリクス側の内膜から内膜の未成熟複合体Ⅲへの会合と、未知の相互作用因子との結合に重要である可能性が示唆された。また、Bcs1 複合体は二つの六量体もしくは十二量体、または相互作用因子と結合して複合体を形成している可能性が考えられた。これらをふまえ、Bcs1 の Rip1 の未成熟複合体Ⅲへの組込みメカニズムについて考察すると、以下の二通りが考えられる。

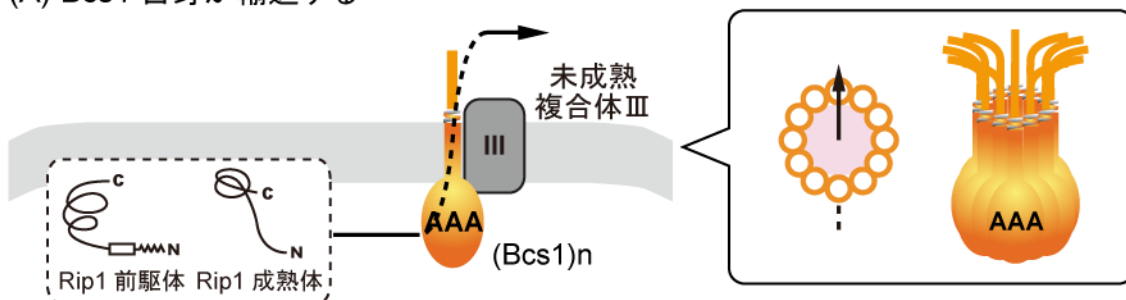
一つ目は、Wagener らが提唱するように Bcs1 自身が輸送担体として Rip1 をマトリクス側の内膜から内膜の未成熟複合体Ⅲへ輸送する場合である (図 40, (A))。前述した Wagener らの仮説のように Bcs1 が六量体を形成し、ATPase 活性でフォールディングしたままの Rip1 が通過しやすいように自身を変形させる可能性も考えられるが、Blue Native-PAGE で検出される複合体のサイズを考慮すると、Bcs1 が十二量体を形成していると考えれば、フォールディングしたままの Rip1 が Bcs1 内を通過することも可能であると予想される。

二つ目は、Bcs1 以外の因子が輸送担体として Rip1 をマトリクス側の内膜から内膜の未成熟複合体Ⅲへ輸送する場合である (図 40, (B))。化学架橋実験より相互作用因子の存在が示唆されていること、そして Bcs1 は Rip1 が会合するまで未成熟複合体Ⅲと結合しているという報告もあることから (Cruciat *et al.*, 1999)、Bcs1 が Rip1 の会合位置を確保し、輸送担体を経由して内膜に輸送された Rip1 と入れ替わる可能性が考えられる。この時に、ATPase 活性や N 末端領域が必要であると予想される。

Bcs1 の 38 番目の残基を親水性アミノ酸に置換したとき、Rip1 はマトリクス側から輸送されなくなり、同時に N 末端領域は野生型と異なる構造をとり、相互作用因子との結合様式も変化する。この膜間部側の変異が、膜を隔ててマトリクス側の ATPase 活性に関与するとは考えにくいいため、Bcs1 自身の ATPase 活性に影響はないとすると、この

膜間部領域の変異によって引き起る Bcs1 の機能不全は、基質や相互作用因子との結合不全が主な原因であると考えられる。

(A) Bcs1 自身が輸送する



(B) Bcs1 以外の因子が輸送する

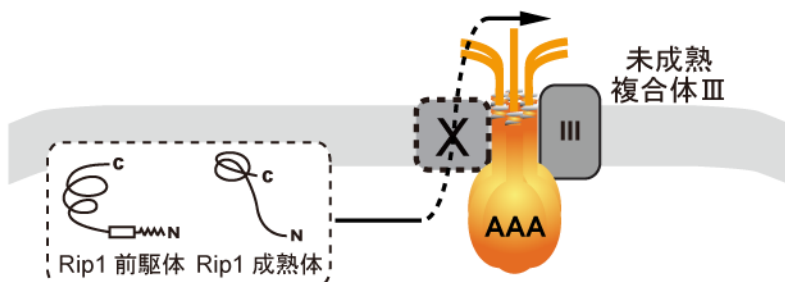


図 40 Rip1 の未成熟複合体IIIへの会合経路仮説

X: 未知の相互作用因子

8)-6 その他の Bcs1 の機能の可能性

膜電位形成能実験の結果から、機能不全を示す変異型 Bcs1 や Bcs1 の欠失により複合体V活性が低下することが明らかになった (図 28)。この時、Bcs1 の変異や欠失は複合体Vの複合体形成には影響しなかった (図 29)。また最近になり、Bcs1 の機能と複合体V活性の関係を示唆する研究が報告されている (Ostojić *et al.*, 2013)。このことから、Rip1 の未成熟複合体IIIへの会合以外にも、Bcs1 は複合体Vの機能維持に関わる役割を持っているのではないかと考えられる。

9) 結語

本研究において、これまで機能未知であった **Bcs1** の膜間部に位置する N 末端領域が、**Bcs1** の機能に必須であることを明らかにした。特に膜貫通領域近傍の 38-40 番目の残基が必須であり、このうち 38 番目の残基がある程度の疎水性を有する必要があることが分かった。この 38 番目の残基を親水性アミノ酸に置換した場合、**Bcs1** 複合体の形成に影響しないが、成熟複合体Ⅲの形成不全を示した。この時の未会合 **Rip1** は、マトリクス側に局在していることが分かった。さらに、この変異により膜間部 N 末端領域は野生型と異なった構造をしていることが明らかになり、同時に相互作用因子との結合様式が野生型と異なっている可能性が示唆された。加えて、**Bcs1** は **Rip1** の会合以外の機能として、呼吸鎖複合体Vの活性に関与している可能性が示唆された。

bcs1 欠失株における未会合 **Rip1** の分解は、主にマトリクスに局在する **Lon** プロテアーゼによって行われることが分かった。また、**Lon** プロテアーゼは **Rip1** の成熟に関わる可能性が示唆された。

以下に、明らかにしたことを端的に示す。

- (1) **Bcs1** の N 末端領域は、呼吸活性に必須である。
- (2) **Bcs1** の N 末端領域は、**Bcs1** 自身の複合体形成には影響しない。
- (3) **Bcs1** の N 末端領域は、相互作用因子との結合に関与する。
- (4) **Bcs1** の N 末端領域は、**Rip1** の未成熟複合体Ⅲへの会合に重要である。
- (5) **Rip1** は、**Bcs1** 非依存的にマトリクス側の内膜に局在する。
- (6) **Bcs1** は、複合体Vの活性に関与する。
- (7) 未会合 **Rip1** は、主に **Lon** プロテアーゼにより分解される。
- (8) **Lon** プロテアーゼは、**Rip1** の成熟に関わる。

これらの結果は、**Bcs1** の機能と **Rip1** のミトコンドリア内での挙動を理解するうえで、重要な知見であると考えられる。

10) 参考文献

Atkinson A., Smith P., Fox J.L., Cui T.Z., Khalimonchuk O. and Winge D.R. (2011) The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Mol. Cell Biol.* 31: 3988-3996.

Bähler J., Wu J.Q., Longtine M.S., Shah N.G., McKenzie A. 3rd, Steever A.B., Wach A., Philippsen P. and Pringle J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14: 943-951.

Bayot A., Gareil M., Rogowska-Wrzesinska A., Roepstorff P., Friguet B. and Bulteau A.L. (2010) Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1. *J. Biol. Chem.* 285: 11445-11457.

Berry E.A., Guergova-Kuras M., Huang L.S. and Crofts A.R. (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 1005-1075.

Casari G., De Fusco M., Ciarmatori S., Zeviani M., Mora M., Fernandez P., De Michele G., Filla A., Coccozza S., Marconi R., Dürr A., Fontaine B. and Ballabio A. (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93: 973-983.

Conte L., Trumpower B.L. and Zara V. (2011) Bcs1p can rescue a large and productive cytochrome *bc*₍₁₎ complex assembly intermediate in the inner membrane of yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1813: 91-101.

Cox G.A., Mahaffey C.L., Nystuen A., Letts V.A. and Frankel W.N. (2000) The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development. *Nat. Genet.* 26: 198-202.

Cruciat C.M., Hell K., Fölsch H., Neupert W. and Stuart R.A. (1999) Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc*₍₁₎ complex. *EMBO J.* 18: 5226-5233.

Cui T.Z., Smith P.M., Fox J.L., Khalimonchuk O. and Winge D.R. (2012) Late-stage maturation of the Rieske Fe/S protein: Mzm1 stabilizes Rip1 but does not facilitate its translocation by the

AAA ATPase Bcs1. *Mol. Cell Biol.* 32: 4400-4409.

van Dyck L., Neupert W. and Langer T. (1998) The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* 12: 1515-1524.

Everard-Gigot V., Dunn C.D., Dolan B.M., Brunner S., Jensen R.E. and Stuart R.A. (2005) Functional analysis of subunit e of the F1Fo-ATP synthase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: importance of the N-terminal membrane anchor region. *Eukaryot. Cell* 4: 346-355.

Fölsch H., Guiard B., Neupert W. and Stuart R.A. (1996) Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *EMBO J.* 15: 479-487.

藤木幸夫. (2004) ペルオキシソームの形成とペルオキシソーム病. *蛋白質核酸酵素* 42: 1136-1142.

Ghezzi D., Arzuffi P., Zordan M., Da Re C., Lamperti C., Benna C., D'Adamo P., Diodato D., Costa R., Mariotti C., Uziel G., Smiderle C. and Zeviani M. (2011) Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nat. Genet.* 43: 259-263.

Grandier-Vazeille X., Bathany K., Chaignepain S., Camougrand N., Manon S. and Schmitter J.M. (2001) Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry* 40: 9758-9769.

Hazan J., Fonknechten N., Mavel D., Paternotte C., Samson D., Artiguenave F., Davoine C.S., Cruaud C., Dürr A., Wincker P., Brottier P., Cattolico L., Barbe V., Burgunder J.M., Prud'homme J.F., Brice A., Fontaine B., Heilig B. and Weissenbach J. (1999) Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat. Genet.* 23: 296-303.

Higashiyama H., Hirose F., Yamaguchi M., Inoue Y.H., Fujikake N., Matsukage A. and Kakizuka A. (2002) Identification of *ter94*, *Drosophila* VCP, as a modulator of polyglutamine-induced neurodegeneration. *Cell Death Differ.* 9: 264-273.

Hinson J.T., Fantin V.R., Schönberger J., Breivik N., Siem G., McDonough B., Sharma P.,

Keogh I., Godinho R., Santos F., Esparza A., Nicolau Y., Selvaag E., Cohen B.H., Hoppel C.L., Tranebjaerg L., Eavey R.D., Seidman J.G. and Seidman C.E. (2007) Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *N. Engl. J. Med.* 356: 809-819.

Isaya G., Kalousek F., Fenton W.A. and Rosenberg L.E. (1991) Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *J. Cell Biol.* 113: 65-76.

Johnson J.O., Mandrioli J., Benatar M., Abramzon Y., Van Deerlin V.M., Trojanowski J.Q., Gibbs J.R., Brunetti M., Gronka S., Wu J., Ding J., McCluskey L., Martinez-Lage M., Falcone D., Hernandez D.G., Arepalli S., Chong S., Schymick J.C., Rothstein J., Landi F., Wang Y.D., Calvo A., Mora G., Sabatelli M., Monsurrò M.R., Battistini S., Salvi F., Spataro R., Sola P., Borghero G.; ITALSGEN Consortium, Galassi G., Scholz S.W., Taylor J.P., Restagno G., Chiò A. and Traynor B.J. (2010) Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. *Neuron* 68: 857-864.

Karata K., Inagawa T., Wilkinson A.J., Tatsuta T. and Ogura T. (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *J. Biol. Chem.* 274: 26225-26232.

Kispal G., Csere P., Guiard B. and Lill R. (1997) The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett.* 418: 346-350.

Kyte J. and Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

Leonhard K., Herrmann J.M., Stuart R.A., Mannhaupt G., Neupert W. and Langer T. (1996) AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* 15: 4218-4229.

Ljungdahl P.O., Beckmann J.D. and Trumpower B.L. (1989) Mutational analysis of the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein of *Saccharomyces cerevisiae*. II. Biochemical characterization of temperature-sensitive RIP1- mutations. *J. Biol. Chem.* 264: 3723-3731.

Long A.R., Yang M., Kaiser K. and Shepherd D. (1998) Isolation and characterisation of smallminded, a *Drosophila* gene encoding a new member of the Cdc48p/VCP subfamily of AAA proteins. *Gene* 208: 191-199.

de Lonlay P., Valnot I., Barrientos A., Gorbatyuk M., Tzagoloff A., Taanman J.W., Benayoun E., Chrétien D., Kadhom N., Lombès A., de Baulny H.O., Niaudet P., Munnich A., Rustin P. and Rötig A. (2001) A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat. Genet.* 29: 57-60.

Lubianca Neto J.F., Lu L., Eavey R.D., Flores M.A., Caldera R.M., Sangwatanaroj S., Schott J.J., McDonough B., Santos J.I., Seidman C.E. and Seidman J.G. (1998) The Björnstad syndrome (sensorineural hearing loss and pili torti) disease gene maps to chromosome 2q34-36. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 1107-1112.

Lupas A.N. and Martin J. (2002) AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 746-753.

Maltecca F., Magnoni R., Cerri F., Cox G.A., Quattrini A. and Casari G. (2009) Haploinsufficiency of *AFG3L2*, the gene responsible for spinocerebellar ataxia type 28, causes mitochondria-mediated Purkinje cell dark degeneration. *J. Neurosci.* 29: 9244-9254.

Mathieu L., Marsy S., Saint-Georges Y., Jacq C. and Dujardin G. (2011) A transcriptome screen in yeast identifies a novel assembly factor for the mitochondrial complex III. *Mitochondrion* 11: 391-396.

村本賢志. (2009) 酵母ミトコンドリアに局在する AAA タンパク質 Bcs1p の機能解析. 熊本大学大学院医学教育部医科学専攻修士論文

Melo A.M., Duarte M., Møller I.M., Prokisch H., Dolan P.L., Pinto L., Nelson M.A. and Videira A. (2001) The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276: 3947-3951.

Nijtmans L.G., de Jong L., Artal Sanz M., Coates P.J., Berden J.A., Back J.W., Muijsers A.O., van der Spek H. and Grivell L.A. (2000) *EMBO J.* 19: 2444-2451.

錦織伸吾, 小椋光. (2006) タンパク質を解きほぐす AAA+シャペロン. *生物工学* 84:

404-406.

Nobrega F.G., Nobrega M.P. and Tzagoloff A. (1992) BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 11: 3821-3829.

Nouet C., Truan G., Mathieu L. and Dujardin G. (2009) Functional analysis of yeast *bcs1* mutants highlights the role of Bcs1p-specific amino acids in the AAA domain. J. Mol. Biol. 388: 252-261.

Ogura T. and Wilkinson A.J. (2001) AAA⁺ superfamily ATPases: common structure--diverse function. Genes Cells 6: 575-597.

Ostojić J., Panozzo C., Lasserre J.P., Nouet C., Courtin F., Blancard C., di Rago J.P. and Dujardin G. (2013) The energetic state of mitochondria modulates complex III biogenesis through the ATP-dependent activity of Bcs1. Cell Metab. 18: 567-577.

Pallanck L., Ordway R.W. and Ganetzky B. (1995) A *Drosophila* NSF mutant. Nature 376: 25.

Priest J.W. and Hajduk S.L. (1996) In vitro import of the Rieske iron-sulfur protein by trypanosome mitochondria. J. Biol. Chem. 271: 20060-20069.

Rottgers K., Zufall N., Guiard B. and Voos W. (2002) The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. J. Biol. Chem. 277: 45829-45837.

Sambrook J. and Russell D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring harbor, New York.

Sánchez E., Lobo T., Fox J.L., Zeviani M., Winge D.R. and Fernández-Vizarra E. (2013) LYRM7/MZM1L is a UQCRFS1 chaperone involved in the last steps of mitochondrial Complex III assembly in human cells. Biochim. Biophys. Acta 1827: 285-293.

Shirogane T., Fukada T., Muller J.M., Shima D.T., Hibi M. and Hirano T. (1999) Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis.,

Immunity 11: 709-719.

Sikorski R.S. and Hieter P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27.

Smith J.L., Zhang H., Yan J., Kurisu G. and Cramer W.A. (2004) Cytochrome bc complexes: a common core of structure and function surrounded by diversity in the outlying provinces. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 432-439.

Smith P.M., Fox J.L. and Winge D.R. (2012) Biogenesis of the cytochrome *bc*₁ complex and role of assembly factors. *Biochim. Biophys. Acta* 1817: 276-286.

Tatsuta T. (2009) Protein quality control in mitochondria. *J. Biochem.* 146: 455-461.

Visapää I., Fellman V., Vesa J., Dasvarma A., Hutton J.L., Kumar V., Payne G.S., Makarow M., Van Coster R., Taylor R.W., Turnbull D.M., Suomalainen A. and Peltonen L. (2002) GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 863-876.

Wagener N., Ackermann M., Funes S. and Neupert W. (2011) A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Mol. Cell* 44: 191-202.

Wagener N. and Neupert W. (2012) Bcs1, a AAA protein of the mitochondria with a role in the biogenesis of the respiratory chain. *J. Struct. Biol.* 179: 121-125.

Wagner I., Arlt H., van Dyck L., Langer T. and Neupert W. (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* 13: 5135-5145.

Wagner K., Rehling P., Sanjuán Szklarz L.K., Taylor R.D., Pfanner N. and van der Laan M. (2009) Mitochondrial F₁F_o-ATP synthase: the small subunits e and g associate with monomeric complexes to trigger dimerization. *J. Mol. Biol.* 392: 855-861.

Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. and Gay N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes

and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.

Watts G.D., Wymer J., Kovach M.J., Mehta S.G., Mumm S., Darvish D., Pestronk A., Whyte M.P. and Kimonis V.E. (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat. Genet.* 36: 377-381.

Wu D., Chen P.J., Chen S., Hu Y., Nuñez G. and Ellis R.E. (1999) *C. elegans* MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death. *Development* 126: 2021-2031.

Yamada-Inagawa T., Okuno T., Karata K., Yamanaka K. and Ogura T. (2003) Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 278: 50182-50187.

Yasuda S., Inoue K., Hirabayashi M., Higashiyama H., Yamamoto Y., Fuyuhiko H., Komure O., Tanaka F., Sobue G., Tsuchiya K., Hamada K., Sasaki H., Takeda K., Ichijo H. and Kakizuka A. (1999) Triggering of neuronal cell death by accumulation of activated SEK1 on nuclear polyglutamine aggregations in PML bodies. *Genes Cells* 4: 743-756.