

## ミトコンドリア内膜の ADP/ATP 透過担体の C 末端領域の構造特性と機能

篠原康雄,<sup>\*,a,b</sup> 橋本 満,<sup>c</sup> 木平孝高,<sup>d</sup> 大倉一人,<sup>e</sup> 真島英司,<sup>f</sup> 寺田 弘<sup>g</sup>

## Structural and Functional Properties of the C-terminal Region of Mitochondrial ADP/ATP Carrier

Yasuo SHINOHARA,<sup>\*,a,b</sup> Mitsuru HASHIMOTO,<sup>c</sup> Yoshitaka KIHIRA,<sup>d</sup>Kazuto OHKURA,<sup>e</sup> Eiji MAJIMA,<sup>f</sup> and Hiroshi TERADA<sup>g</sup>

<sup>a</sup>Institute for Genome Research, <sup>d</sup>Institute of Health Biosciences, University of Tokushima, Kuramotocho-3, Tokushima 770-8503, Japan, <sup>b</sup>Faculty of pharmaceutical Science, University of Tokushima, Shomachi-1, Tokushima 770-8505, Japan, <sup>c</sup>Faculty of pharmaceutical Science, Matsuyama University, Bunkyocho-4, Matsuyama 790-8578, Japan, <sup>e</sup>Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science, Shiomicho-3, Choshi 288-0025, Japan, <sup>f</sup>Protenova, Inc., Hayashicho 2217, Takamatsu 761-0301, Japan, and <sup>g</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, Yamazaki 2641, Noda 278-8510, Japan

(Received September 1, 2009)

Mitochondrial ADP/ATP carrier (AAC) is a protein catalyzing the transport of adenine nucleotides across inner mitochondrial membrane. In this review article, we first briefly introduce structural and functional properties of this protein. Next, we describe the results of our recent studies on the difference in the C-terminal region between yeast type 2 AAC isoform and bovine type 1 AAC isoform. Furthermore, based on the reactivities of cysteine residues that replaced amino acids in the sixth transmembrane segment, the probable structural features of the C-terminal region of this carrier are discussed.

**Key words**—ADP/ATP carrier (AAC); solute carrier family; mitochondria; transport mechanism; yeast

## 1. はじめに

ミトコンドリアは細胞内での主たるエネルギー変換の場であり、ここで生体が摂取した栄養分のエネルギーは生体が利用可能な ATP の形に変換される。ATP はミトコンドリア内膜を介した H<sup>+</sup> の電気化学ポテンシャル差を駆動力としてマトリックス内で合成される。効率的な ATP の合成を可能にするために、形成された H<sup>+</sup> の電気化学ポテンシャル差が自発的に消失してしまわないように、ミトコンドリア

内膜のイオンや溶質に対する透過性は極めて低く保たれている。一方で、ミトコンドリアのマトリックス内は ATP 合成の場であるだけでなく、クエン酸サイクルや脂肪酸の β 酸化なども行われる場所であり、これらの反応に係わる多くの分子がミトコンドリアの内膜を介して輸送される必要がある。このような分子はミトコンドリア内膜に存在する溶質輸送担体と呼ばれるタンパク質によって輸送されていることが知られている。これらの輸送担体はいずれも分子サイズがおおよそ 30 kDa の 6 回膜貫通型タンパク質であり、分子中に 3 回の繰り返し構造を有すること、PDKR モチーフ (PXD/EXXX/R) と呼ばれる保存されたアミノ酸配列が観察されることなどの構造的特徴から、共通の祖先遺伝子から形成されたものと考えられており、ミトコンドリア輸送担体ファミリー (SLC25 ファミリーと命名されている) として扱われている。<sup>1)</sup> 本稿で紹介する ADP/ATP 透過担体はこのファミリーのうち最初に同定されたタンパク質である。

<sup>a</sup>徳島大学疾患ゲノム研究センター (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18), <sup>b</sup>徳島大学薬学部 (〒770-8505 徳島市庄町 1-78), <sup>c</sup>松山大学薬学部 (〒790-8578 愛媛県松山市文京町 4-2), <sup>d</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 (〒770-8503 徳島市蔵本町 3-18), <sup>e</sup>千葉科学大学薬学部 (〒288-0025 千葉県銚子市潮見町 3), <sup>f</sup>株式会社プロテノバ (〒761-0301 香川県高松市林町 2217-44), <sup>g</sup>東京理科大学薬学部 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641)

\*e-mail: yshinoha@genome.tokushima-u.ac.jp

本総説は日本薬学会第 129 年会シンポジウム S27 で発表されたものを中心に記述したものである。

## 2. ADP/ATP 透過担体の構造と機能特性<sup>2-5)</sup>

哺乳類のミトコンドリアの ADP/ATP 透過担体は 297 アミノ酸残基からなる 32 kDa 程度のタンパク質である。最初に一次構造が決定されたのはウシの心臓のミトコンドリアに発現した ADP/ATP 透過担体であり、現在心筋型のアイソフォームとして知られる AAC1 のものであった。これまで哺乳類では 3 種のアイソフォームが存在するとされてきたが (げっ歯類では 3 型アイソフォームが欠失しており 2 種)、最近睾丸に選択的に発現した第 4 のアイソフォームの存在が報告された。<sup>6,7)</sup> しかし、アイソフォーム間の機能の違いに関する知見はまだほとんど報告されていない。

化学修飾実験などの結果から、このタンパク質は N 末端と C 末端の両方をサイトソル側に突出させた 6 回膜貫通構造をとるものと考えられてきた。<sup>8)</sup> 最近の X 線結晶構造解析の結果もこれまでの知見が妥当であることを証明するものであった。<sup>9)</sup>

またこのタンパク質の機能としては、文字通りミトコンドリア内膜を介した ADP と ATP の交換輸送を行うものであるが、特に ADP と ATP に親和性が高くこれら 2 種のアデニンヌクレオチドのみを選択的に輸送する。基質結合部位をサイトソル側に向けた c 状態とマトリックス側に向けた m 状態の 2 つのコンホメーションをとり、これら 2 つのコンホメーションを相互変換することによって結合した

ヌクレオチドの輸送を行っていると考えられている。また、このタンパク質の特異的阻害剤として、西洋アザミから単離されたカルボキシアトラクチロシドと *Pseudomonas cocovenenans* が産生するボンクレキ酸が知られているが、これらはこの担体をそれぞれ c 状態、m 状態に固定することによってその輸送活性を阻害することが知られている。タンパク質のコンホメーション変化の様子とそれぞれのコンホメーションに親和性の高い 2 種の阻害剤の構造を Fig. 1 に示す。

## 3. 遺伝子改変酵母を用いた ADP/ATP 透過担体の構造と機能の解析

特定のタンパク質の構造と機能の関係を研究する場合には発現系の利用が効果的で、部位特異的な変異によってもたらされるタンパク質の機能の変化から、構造と機能の議論がなされることが多い。最も一般的な人工的なタンパク質の発現系は大腸菌を用いる系であると思われるが、輸送担体などの膜タンパク質の場合には発現させたタンパク質は封入体となることが多く、その機能を解析するためには発現したタンパク質の可溶化、refolding や再構成などの必要が出てくるため大腸菌の発現系は利用し難い。輸送担体を含めミトコンドリアのタンパク質の場合には酵母の発現系の利用が最も効果的である。

酵母を用いた酵母ミトコンドリアの ADP/ATP 透過担体の発現系については、既に Douglas らに

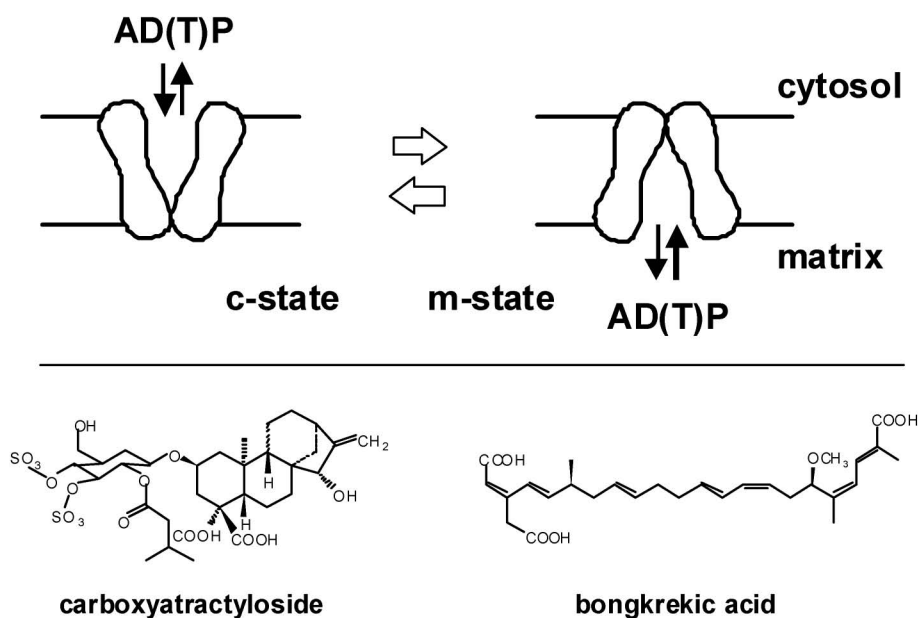


Fig. 1. Proposed Transport Mechanism of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier and Chemical Structures of Its Specific Inhibitors

よって報告されていた。<sup>10)</sup> われわれはウシのミトコンドリアに発現した 1 型の ADP/ATP 透過担体 (AAC1) を対象とした研究を進めてきたが、酵母の発現系を利用したウシの AAC1 変異体の調製にも着手した。酵母で恒常的に発現している AAC2 のプロモーターをプラスミドに乗せ、その下流にウシの AAC1 をコードする cDNA をサブクローニングすることによってウシの AAC1 の発現プラスミドを構築した。ついで酵母の内在性の AAC をコードする 3 種の遺伝子を破壊した株を作成し、ここに調製したウシの AAC1 の発現プラスミドを導入することによって酵母にウシの AAC1 を発現させることを試みた。その結果、native なウシの AAC1 を酵母に発現することはできなかつた。そこで、酵母の AAC2 とウシの AAC1 のアミノ酸配列を比較したところ、N 末端の長さが酵母とウシの AAC では顕著に異なり、酵母の AAC2 のほうがウシの AAC1 よりも 15 残基長いことが判明した (Fig. 2)。この N 末端の長さの違いがウシの AAC1 を発現させることができるかどうかに影響を与えている可能性が考えられたので、ウシの AAC1 の N 末端を酵母の AAC2 の N 末端と置き換えたキメラ AAC の発現ベクターを調製し、これを内在性の AAC をコードする遺伝子を破壊した酵母に導入した。その結果、酵母でウシの AAC1 (ただし N 末端は酵母の AAC2 のアミノ酸配列) を発現させることができ、酵母の発現系を用いた哺乳類の AAC 研究の道を開くことができた。<sup>11)</sup>

#### 4. 最近の C 末端領域に関する研究事例から

上述の通り、酵母の AAC2 とウシの AAC1 を比較すると N 末端の違いが顕著であったが、C 末にも若干の違いが認められた。このタンパク質の C 末端はその機能発現における重要性が指摘されながらも、まだこの領域の構造的、機能的な特性に関する報告はなされていなかったため、最近われわれはこの領域に焦点をあてた研究を推進した。本稿では特にこの研究成果について紹介したい。

酵母の AAC2 とウシの AAC1 の C 末を比較すると、酵母の AAC2 ではウシの AAC1 の C 末から 4 残基目と 5 残基目の間に 6 残基のアミノ酸配列を挿入した形になっていることが明らかである。そこで ADP/ATP 透過担体の機能発現におけるこの領域の重要性を検討する目的で、酵母の AAC2 とウシの AAC1 の C 末端を順に 1 残基ずつ欠失させた変異株の発現ベクターを調製し、これを機能的な AAC 遺伝子を欠落させた酵母細胞に導入した。

酵母はミトコンドリアの機能が完全に欠失した状態であっても解糖系だけの機能で生育可能であるため、機能的な AAC 遺伝子を欠落させた酵母細胞であっても、グルコースを炭素源とした培地上では生育可能である。一方、グリセリンを単一炭素源とした場合には、ATP はミトコンドリアでの酸化的リン酸化反応でしか合成できなくなるので、機能的な AAC 遺伝子を欠落させた酵母細胞は成育不能となる。したがって、グリセリンを単一炭素源とした寒天培地上での生育を観察することによって、発現さ

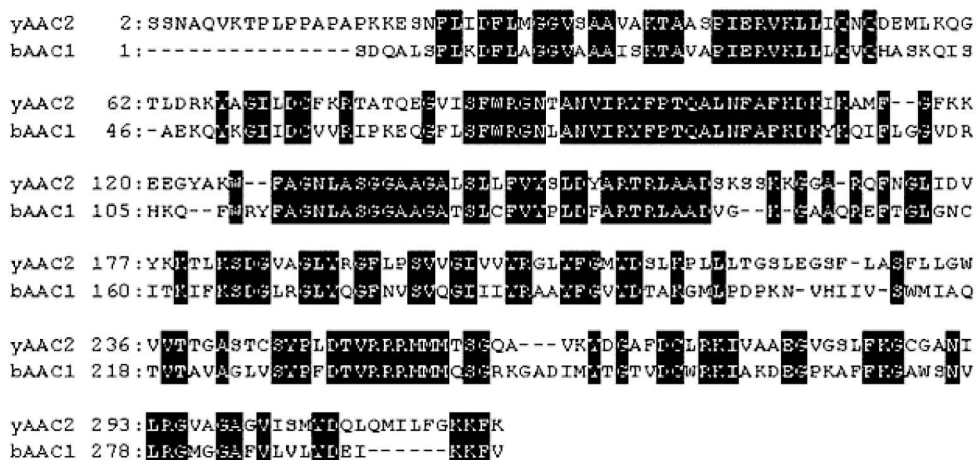


Fig. 2. Homology Alignment of the Amino Acid Sequence of Yeast AAC2 (yAAC2) and Bovine AAC1 (bAAC1)

The two amino acid sequences were aligned to show maximum matching, and hyphens represent inserted gaps. Conserved amino acid residues between the two carriers are shown by white lettering on a black background.

せた ADP/ATP 透過担体の機能を荒っぽく見積もることが可能である。

その結果, Fig. 3 に示すように, 酵母の AAC2 の C 末端を 6 残基目まで欠失させても AAC2 の機能には大きな支障はないが, 7 残基目を欠失させると完全に機能が消失することが明らかになった. 7 残基を欠失させた場合にも, ミトコンドリアでの発現は影響を受けていなかったことから, 7 残基目は発現に重要なのではなく, 機能に重要であることが明らかになった. また, Fig. 4 に示すように, ウシの AAC1 (実際には N 末端を酵母の AAC2 の N 末端と置き換えたキメラタンパク質 y2NbAAC1 を用いている) の C 末端を 1 残基欠失させただけでグリセリンを単一炭素源とした寒天培地上での生育がみられなくなること, またこの際に, ミトコンドリアでの発現が顕著に低下していることを明らかにすることができた. 酵母の AAC2 とウシの AAC1 で C 末端のアミノ酸残基の欠失に伴う機能不全が, 前者はタンパク質の発現低下によるものではなく, 後者ではタンパク質の発現低下によるものであるというように異なる理由によるものであったものの, 酵母の AAC2 では欠失させても支障がない C 末端の

長さである 6 アミノ酸残基がちょうどウシの C 末端の長さとの違いであったことは, 機能発現に必要な C 末端の長さが生物種を超えて保存されていることを意味しており興味深いものであった.<sup>12)</sup>

次にわれわれはこの領域のダイナミックな構造特性について検討することにした. われわれは以前の研究において酵母の AAC2 のシステイン残基をすべてアラニンに置換してもそのヌクレオチド輸送活性に支障がないことを明らかにしている.<sup>13)</sup> また, このシステイン不含酵母 AAC2 を基にして, この分子中の特定のアミノ酸残基をシステインに置換した変異株を調製し, それぞれの変異株中でのシステイン残基が外から添加した蛍光性の SH 試薬とどのような反応性を示すかを解析することによって, それぞれのアミノ酸残基の存在様式を議論することができた.<sup>14,15)</sup> そこでこの手法を酵母の AAC2 の C 末端領域に適用し, システインスキニングを行った.

酵母の AAC2 の第 6 膜貫通領域と C 末端を構成すると考えられる 287Gly から 318Lys までのアミノ酸をそれぞれシステインに置換した変異株を調製し, それらをカルボキシアトラクチロシド若しくは

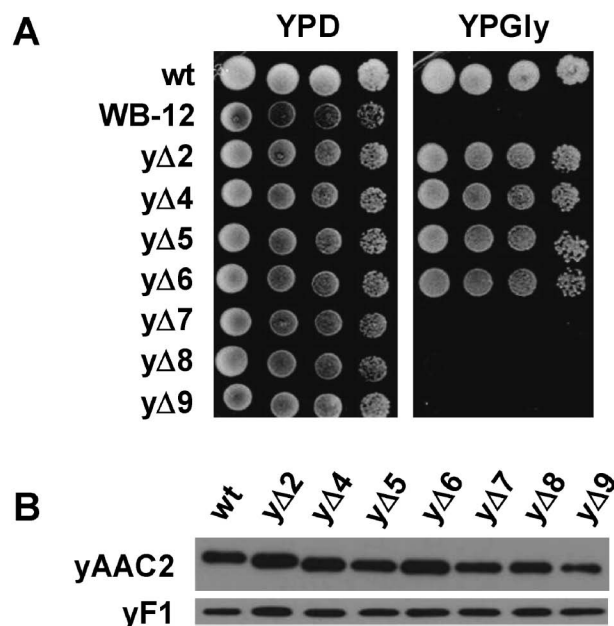


Fig. 3. Functional Features and Expression Levels of C-terminus-truncated Yeast AAC2 Mutants

Panel A presents the viability of transformants expressing various yeast AAC2 mutants on glucose (YPD) or glycerol (YPGly) plates. Panel B presents the results of Western analysis on the expression levels of yeast AAC2 mutants and the  $\beta$  subunit of  $F_1$ -ATPase in the mitochondrial fraction.

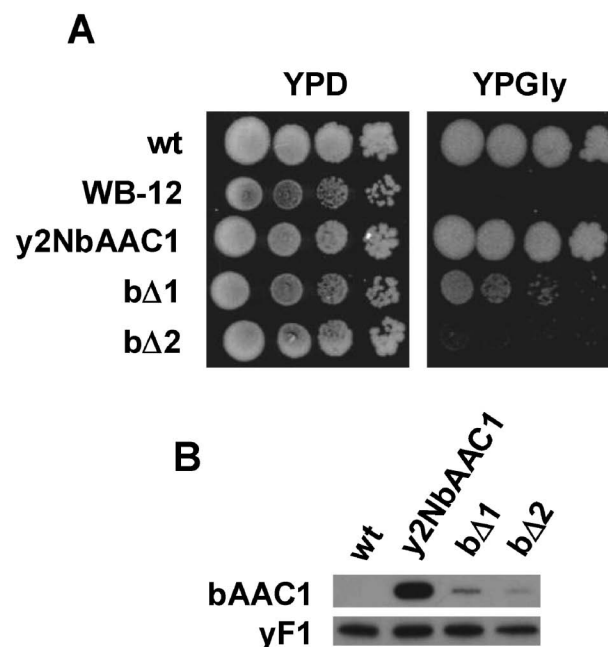


Fig. 4. Functional Features and Expression Levels of C-terminus-truncated Bovine AAC1 Mutants

Panel A presents the viability of transformants expressing various bovine AAC1 mutants on glucose (YPD) or glycerol (YPGly) plates. Panel B shows the results of Western analysis on the expression levels of bovine AAC1 mutants and  $\beta$  subunit of  $F_1$ -ATPase in the mitochondrial fraction.

ボンクレキ酸存在下でエオシンマレイミド処理し、AAC2 のバンドで観察されたエオシンの蛍光強度を測定した。その結果、Fig. 5 に示す通り、310Met から 318Lys までをシステインに置換した変異株ではカルボキシアトラクチロシド、ボンクレキ酸いずれの存在下においてもエオシンマレイミドとよく反応することが明らかになった。したがってこの領域はいずれの条件においても膜から突出した状態になっていると考えられる。一方、第6膜貫通領域を形成すると考えられる 287Gly から 309Gln の間でも、いくつかのアミノ酸残基についてはシステインに置換した場合にエオシンマレイミドと反応することが明らかになり、これらの領域が比較的親

水性の高い環境に面していると考えられた。とりわけ、295Gly と 296Val のシステイン置換体はカルボキシアトラクチロシド存在下のみエオシンマレイミドと反応性を示したので、この担体のコンホメーション変化を反映した結果であると考えられた。

本研究によって明らかにされたウシの AAC1 と酵母の AAC2 の C 末領域の構造的、機能的な特性を Fig. 6 にまとめた。

### 5. おわりに

冒頭でも触れたとおり、ミトコンドリアの ADP/ATP 透過担体は既に X 線結晶構造解析も行われているが、基質の輸送機構の分子論を議論するためには担体のダイナミクスに関する知見の蓄積が重要で

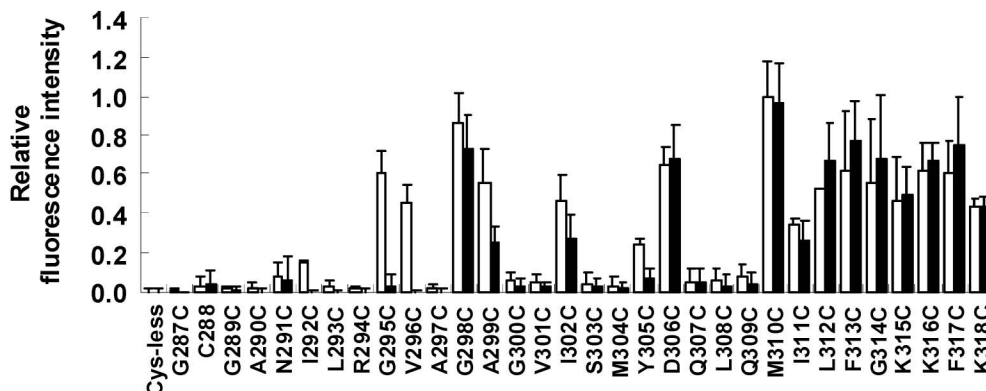


Fig. 5. Reactivities of Single-Cys Mutants of Yeast AAC2 with Fluorescent SH Reagent

Mitochondria isolated from each mutant were incubated with eosin maleimide and the degree of labeling of each mutant was determined. Open and closed bars represent the results obtained in the presence of carboxyatractyloside or bongkreikic acid, respectively.

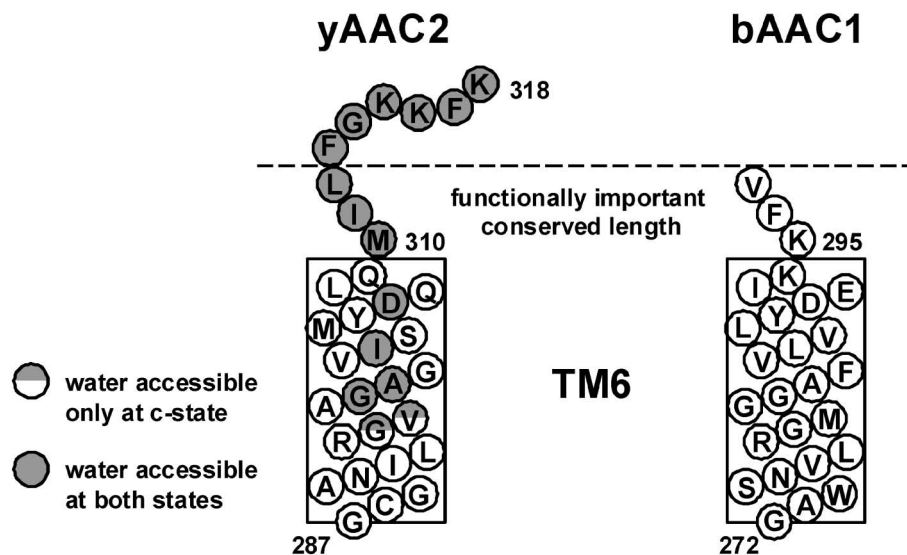


Fig. 6. Summarized Structural and Functional Properties of the C-terminal Region of Yeast AAC2 (yAAC2) and Bovine AAC1 (bAAC1)

ある。その目的でこれらの研究成果が役立つことを期待している。

#### REFERENCES

- 1) Palmieri F., *Pflugers Arch.*, **447**, 689–709 (2004).
- 2) Klingenberg M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 1978–2021 (2008).
- 3) Fiore C., Trezeguet V., Le Saux A., Roux P., Schwimmer C., Dianoux A. C., Noel F., Lauquin G. J., Brandolin G., Vignais P. V., *Biochimie*, **80**, 137–150 (1998).
- 4) Nury H., Dahout-Gonzalez C., Trezeguet V., Lauquin G. J., Brandolin G., Pebay-Peyroula E., *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 713–741 (2006).
- 5) Majima E., Terada H., “Pump and Transporter,” ed. by The Biophysical Society of Japan, Kyoritsu Shuppan, Co., Ltd., Tokyo, 2000, pp. 179–196.
- 6) Dolce V., Scarcia P., Iacopetta D., Palmieri F., *FEBS Lett.*, **579**, 633–637 (2005).
- 7) Rodić N., Oka M., Hamazaki T., Murawski M. R., Jorgensen M., Maatouk D. M., Resnick J. L., Li E., Terada N., *Stem Cells*, **23**, 1314–1323 (2005).
- 8) Majima E., Koike H., Hong Y. M., Shinohara Y., Terada H., *J. Biol. Chem.*, **268**, 22181–22187 (1993).
- 9) Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trezeguet V., Lauquin G. J., Brandolin G., *Nature*, **426**, 39–44 (2003).
- 10) Nelson D. R., Lawson J. E., Klingenberg M., Douglas M. G., *J. Mol. Biol.*, **230**, 1159–1170 (1993).
- 11) Hashimoto M., Shinohara Y., Majima E., Hatanaka T., Yamazaki N., Terada H., *Biochim. Biophys. Acta*, **1409**, 113–124 (1999).
- 12) Iwahashi A., Ishii A., Yamazaki N., Hashimoto M., Ohkura K., Kataoka M., Majima E., Terada H., Shinohara Y., *Mitochondrion*, **8**, 196–204 (2008).
- 13) Hatanaka T., Kihira Y., Shinohara Y., Majima E., Terada H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 936–942 (2001).
- 14) Kihira Y., Iwahashi A., Majima E., Terada H., Shinohara Y., *Biochemistry*, **43**, 15204–15209 (2004).
- 15) Kihira Y., Majima E., Shinohara Y., Terada H., *Biochemistry*, **44**, 184–192 (2005).