

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2009

課題番号：18107003

研究課題名(和文) ミトコンドリアタンパク質の交通管制機構とその改変

研究課題名(英文) Control and alteration of mitochondrial protein traffic

研究代表者

遠藤 斗志也 (TOSHIYA ENDO)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70152014

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアタンパク質の交通を管制するトランスロケータについて、メンテナンス因子 Tam41 を発見、受容体 Tom20 と Tom22 による協調した「行き先シグナル」認識機構の解明、TOM40 複合体と TIM23 複合体の連携機構の解明、インポートモータ補助因子 Tim15 の構造決定、外膜行きシグナルとマトリクス/内膜行きシグナルの優位性決定機構の解明、外膜トランスロケータのサブユニット Tom22 の相互作用マッピング、受容体 Tom20 の行き先シグナル認識能の改変を行った。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanisms of the functions of mitochondrial protein translocators, which control the traffic of mitochondrial proteins, we have discovered a new maintenance factor Tam41, revealed the cooperation of receptors Tom20 and Tom22 in recognition of mitochondrial targeting signals, revealed the cooperation of translocators, the TOM40 complex and TIM23 complex, in transfer of mitochondrial precursor proteins, determined the high-resolution structure of the import motor assistant protein Tim15, analyzed the competition between the sorting signals for the outer membrane and matrix/inner membrane, achieved the interaction mapping of the outer membrane translocator subunit Tom22, and altered the signal recognition functions of the receptor Tom20.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2007 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2008 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2009 年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010 年度	0	0	0
総計	69,000,000	20,700,000	89,700,000

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞小器官, タンパク質輸送

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞内でタンパク質は、生体膜で仕切られたオルガネラに集合して半自律的システムをつくり、複雑な細胞機能を分散管理している。細胞にはこうしたタンパク質群の移動や集合を実現し、維持する交通管制システムが存在し、その中心的役割を担うのがトランスロケータである。ミトコン

ドリアは二枚の生体膜に囲まれているため、特に交通管制の制御は複雑である。

## 2. 研究の目的

酵母ミトコンドリアをとりあげ、その多様なトランスロケータの全貌と動態を把握する。各トランスロケータ構成因子の構造決定を目指し、トランスロケータの作動原

理の一般性と特異性を明らかにし、トランスロケータ間の連携プレーによる交通管制のメカニズムの全貌を解明することをめざす。さらに「行き先シグナル」と受容体の改変による、交通管制機構の改変も試みる。

### 3. 研究の方法

1) 酵母の増殖に必須のミトコンドリアタンパク質のなかから未同定の新因子を検索。(2) トランスロケータのサブユニット、機能ドメインについて構造決定を試みる。

(3) 受容体サブユニットによる基質認識機構を解明。基質認識モチーフを検索するためにペプチド合成機を購入。(4) トランスロケータ間相互作用に欠陥のある変異株を作成すると共に、相互作用を FRET 等でモニターする実験系を構築。(5) 「行き先シグナル」と受容体の同時改変を試みる。

### 4. 研究成果

(1) 新因子 Tam41 の発見 Tam41 は酵母からヒトまでの幅広い生物種間で保存され、内膜のマトリクス側に位置する表在性膜タンパク質である。Tam41 を欠損した酵母株は温度感受性増殖を示し TIM23 複合体経路のタンパク質の Tam41 欠損ミトコンドリアへの取り込みの欠損が観察された。Tam41 が欠損すると TIM23 複合体のコア複合体の構造が変化し、モータータンパク質群の TIM23 コア複合体へのアセンブリーに欠損が生じた。したがって、Tam41 は TIM23 複合体の動的な機能構造を維持するために必要なメンテナンス因子であることが示唆された。

(2) Tom20 と Tom22 による協調した「行き先シグナル」認識 外膜トランスロケータ TOM40 複合体のプレ配列受容体サブユニット Tom22 と Tom20 各々について、膜貫通配列と受容体ドメインの間に TEV プロテアーゼ認識サイトを導入し、ミトコンドリアを単離後、TEV プロテアーゼで処理することにより、Tom20、Tom22 のどちらかの受容体ドメインのみを除去する実験系を構築した。この実験系を用いて、様々なミトコンドリアタンパク質前駆体のミトコンドリアへのインポートの Tom20 依存性と Tom22 依存性を詳細に調べたところ、プレ配列が作る両親媒性ヘリックスの疎水面を Tom20 が、親水面を Tom22 が認識することが示唆された。

(3) TOM40 複合体と TIM23 複合体の連携 ミトコンドリアのマトリクスや内膜へ移行するタンパク質は外膜トランスロケータ TOM40 複合体によって外膜を通過後、内膜のトランスロケータ TIM23 複合体により内膜を通過、または内膜に組み込まれる。TIM23 複合体サブユニット Tim23 と Tim50 はともに

膜間部にドメインを持ち、コイルドコイルを作って相互作用する。そこで両者のコイルドコイル領域の各種変異体を多数作成し、インポートへの影響を解析した。その結果、膜間部における Tim23-Tim50 相互作用は、外膜から内膜への前駆体の受け渡し、およびマトリクス側でのモーター機能の制御という2つの重要な役割を担うことが明らかになった。TIM23 複合体のインテリジェントな膜透過装置としての機能、他のトランスロケータとの連携に関する理解が深まった。

(4) モーター補助因子 Tim15 の構造決定 ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 複合体のモーター因子 mtHsp70 の補助因子である Tim15 の機能を明らかにするために、Tim15 のコアドメインの NMR 構造を決定した。決定された NMR 構造の電荷分布をもとに様々な残基を置換し、変異 Tim15 のみを発現する酵母株の増殖を調べた。その結果、Tim15 の機能は mtHsp70 との相互作用と関連し、その相互作用は mtHsp70 を可溶性に保つ働きがあることが分かった。

(5) 外膜行きシグナルとマトリクス/内膜行きシグナルの優位性解析 Tom40 などのミトコンドリア外膜の  $\beta$  バレル型膜タンパク質は、外膜の TOM40 複合体を通過して膜間部に移行した後、外膜の SAM/TOB 複合体を介して外膜に組み込まれる。マトリクスや内膜、膜間部に移行する前駆体部分を Tom40 の N 端に付加し、ミトコンドリアへのインポートに際してどちらの仕分けシグナルが優勢になるかを解析した。マトリクス行きシグナルは、Tom40 部分の外膜への経路より優勢であるが、内膜行きシグナルの場合は、Tom40 部分は SAM/TOB 複合体と相互作用するステップまでは進めるが、その先のステップに進めなくなる。内膜行きシグナルが切断される膜間部行きシグナルの場合は、Tom40 部分は正常に外膜に組み込まれることが明らかになった。

(6) ミトコンドリア外膜トランスロケータサブユニット Tom22 の相互作用マッピング ミトコンドリア外膜のトランスロケータ TOM40 複合体の中心因子である Tom22 の様々な部位に、*in vivo* で部位特異的に、光架橋性アミノ酸 BPA を導入した。紫外線照射により BPA 近傍のタンパク質との架橋を行い、架橋産物を抗体で検出した。さらに TOM40 複合体に基質である前駆体を膜透過中間体として蓄積させ、Tom20 の相互作用マッピングのパターンがどのように変化するかを解析した。

(7) 受容体 Tom20 の改変 ミトコンドリアタンパク質のプレ配列受容体である Tom20 を改変し、野生型 Tom20 には依存せず、改変 Tom20 にのみ依存してミトコンドリアに取りこまれるような新規プレ配列を選別する酵母

母スクリーニング系の構築を試みた。酵母ミトコンドリアの CoxIV (シトクロム酸化酵素のサブユニット) の遺伝子欠損株は呼吸能がないが、ここにプラスミドで CoxIV 前駆体の遺伝子を供給すると、発現産物がミトコンドリア内に移行し、シトクロム酸化酵素に組み込まれるため呼吸能が回復する。ここで、Tom20 を改変 Tom20 に置き換えると、CoxIV 前駆体のプレ配列が認識されないため、CoxIV はミトコンドリアに移行できず、呼吸能は回復しない。プラスミドで供給する CoxIV 前駆体遺伝子のプレ配列部分を大腸菌ゲノム由来のランダムペプチドライブラリにランダムに置き換え、この中から、CoxIV 遺伝子欠損株の呼吸能を回復できるものを選別することで、改変 Tom20 に認識される変異プレ配列の探索を試みた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 19 件、すべて査読あり)

1. T. Endo, K. Yamano (2011) Structural insight into the mitochondrial protein import system . *Biochim. Biophys. Acta (Biomembranes)* 1808, 955-970.
2. S.C. Botelho, M. Osterberg, A.S. Reichert, K. Yamano, P. Bjorkholm, T. Endo, G. von Heijne, and H. Kim (2011) TIM23-mediated insertion of transmembrane  $\alpha$ -helices into the mitochondrial inner membrane. *EMBO J.* 30, 1003-1011.
3. H. Yamamoto, N. Itoh, S. Kawano, Y. Yatsukawa, T. Momose, T. Makio, M. Matsunaga, M. Yokota, M. Esaki, T. Shodai, D. Kohda, A.E.A. Hobbs, R.E. Jensen, and T. Endo (2011) Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 91-96.
4. K. Yamano, S. Tanaka-Yamano, and T. Endo (2010) Tom7 regulates Mdm10-mediated assembly of the mitochondrial import channel protein Tom40. *J. Biol. Chem.* 285, 41222-41231.
5. T. Endo, K. Yamano, and S. Kawano (2010) Structural basis for the disulfide relay system in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1359-1373.
6. K. Yagawa, K. Yamano, T. Oguro, M. Maeda, T. Sato, T. Momose, S. Kawano, and T. Endo (2010) Structural basis for unfolding pathway-dependent stability of proteins: vectorial unfolding vs. global unfolding . *Protein Science*, 19, 693-702.
7. Y. Harada, Y. Tamura, and T. Endo (2010) Identification of yeast Art5 as a multicopy suppressor for the mitochondrial translocator maintenance protein Tam41. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 228-233.
8. K. Yamano, S. Tanaka-Yamano, and T. Endo (2010) Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40. *EMBO Rep.* 11, 187-193.
9. T. Endo and K. Yamano (2010) Transport of proteins across or into the mitochondrial outer membrane *Biochim. Biophys. Acta (Molecular Cell Research)*, 1803, 706-714.
10. S. Kawano, K. Yamano, M. Naoe, T. Momose, K. Terao, S. Nishikawa, N. Watanabe, and T. Endo (2010) Structural basis of yeast Tim40 as an oxidative translocator in the mitochondrial intermembrane space . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106,14403-14407.
11. T. Endo and K. Yamano (2010) Multiple pathways for mitochondrial protein traffic . *Biol. Chem.* 390, 723-730.
12. Y. Tamura, T. Endo, M. Iijima, and H. Sesaki (2009) Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. *J. Cell Biol.* 185, 1029-1045.
13. Y. Tamura, Y. Harada, T. Shiota, K. Yamano, K. Watanabe, M. Yokota, H. Yamamoto, H. Sesaki, and T. Endo (2009) Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *J. Cell Biol.* 184, 129-141.
14. T. Oguro, K. Yagawa, T. Momose, T. Sato, K. Yamano, and T. Endo (2009) Structural stabilities of different regions of the titin I27 domain contribute differently to unfolding upon mitochondrial protein import. *J. Mol. Biol.* 385, 811-819.
15. K. Yamano, M. Kuroyanagi-Hasegawa, M. Esaki, M. Yokota, and T. Endo (2008) Step size analyses of the mitochondrial Hsp70 import motor reveal the Brownian ratchet in operation. *J. Biol. Chem.* 283, 27325-27332.
- 遠藤斗志也 (2008) ミトコンドリアを舞台とするタンパク質の交通. *生物物理* 48, 4-10
16. K. Yamano, Y. Yatsukawa, M. Esaki, A. E. A. Hobbs, R. E. Jensen, and T. Endo (2008) Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* 283, 3799-3807.
17. T. Saitoh, M. Igura, T. Obita, T. Ose, R. Kojima, K. Maenaka, T. Endo, and D. Kohda (2007) Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J.* 26,

- 4777-4787.
18. T. Momose, C. Ohshima, M. Maeda, T. Endo (2007) Structural basis of functional cooperation of Tim15/Zim17 with yeast mitochondrial Hsp70. *EMBO Rep.* 8, 664-670.
  19. Y. Tamura, Y. Harada, K. Yamano, K. Watanabe, D. Ishikawa, C. Ohshima, S. Nishikawa, H. Yamamoto, and T. Endo (2006) Identification of Tam41 maintaining integrity of the TIM23 protein translocator complex in mitochondria. *J. Cell Biol.* 174, 615-623.

[学会発表] (計 91 件)

1. Toshiya Endo: Structural aspects of import and assembly of mitochondrial proteins. *Structural aspects of import and assembly of mitochondrial proteins.* 2010.9.13-16. 奈良
2. Toshiya Endo: Molecular mechanisms of biogenesis of mitochondria. *The 65th West Lake International Symposium of Zhejiang University (The Zhejiang University and Nagoya University Joint Symposium on Life Sciences)* 2010.11.20, Hangzhou, China.
3. Toshiya Endo: Structural insight into mitochondrial protein import. *GCOE/Structural Biology Research Center International Symposium: Protein structure and dynamics; from molecules to assembly.* 2010.11.23-24, 名古屋.
4. 遠藤斗志也: ミトコンドリアタンパク質の交通と進化. *BMB2010 シンポジウム「膜タンパク質の構造・機能から見るオルガネラの進化」*. 2010.12.7-10 神戸
5. 遠藤斗志也: *In vivo* 部位特異的光架橋: 細胞内のタンパク質間相互作用に高空間分解能で迫る. 第 61 回細胞生物学会大会. 日本ミリポアランチョンセミナー 2009.6.2-4. 名古屋.
6. Toshiya Endo: Role of a chaperone Hsp70 in mitochondrial protein translocation and a folding enzyme PDI in the ER-associated degradation. 2009 International Symposium and Annual Meeting of The Korean Society for Microbiology and Biotechnology. 2009.6.25-26. Daejeon, Korea
7. Toshiya Endo: Multiple and sophisticated pathways of mitochondrial protein traffic. Heidelberg Molecular Life sciences Conferences on Cellular Protein Transport. 2009.10.1-3. Heidelberg, Germany
8. Toshiya Endo: Cooperation of translocators in mitochondrial protein traffic. The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. 2009.10.6-9. 札幌
9. 遠藤斗志也: ミトコンドリアタンパク質の交通を完成する膜透過装置. 第 82 回日本生化学会大会シンポジウム「タンパク質膜透過装置の構造とダイナミックな機能」2009.10.21-24. 神戸
10. Toshiya Endo: New and old look of mitochondrial protein import. International Symposium Mitochondria and Friends. 2009.10.30. Munich, Germany
11. 遠藤斗志也: Mitochondrial biogenesis and mitochondrial protein traffic. 第 32 回分子生物学会年会 シンポジウム「Molecular dynamism of protein traffic and organelle biogenesis」. 2009.12-9-12. 横浜
12. 遠藤斗志也: ミトコンドリア膜を舞台としたタンパク質の一生. 臨床研セミナー. 2010.2.10. 東京
13. Toshiya Endo: Import and assembly of mitochondrial proteins. International Symposium Fifty Years of Biophysics Research and Nagoya University. 2010.3.12-14. 名古屋
14. Toshiya Endo: Control and alteration of protein traffic in the cell. The Uehara Memorial Foundaton Symposium "System Biology: The Challenge of Complexity". 2008.6.30-7.2. 東京
15. Toshiya Endo: Coordinated functions of mitochondrial translocator proteins for protein translocation across and into the membranes. EMBO Conference on Control, Co-ordination and Regulation of Protein Targeting and Translocation. 2008.10.25-29. Saint Maxime, France
16. Toshiya Endo: Structural basis of molecular recognition in mitochondrial protein import. International Symposium on Molecular Soft Interactions in Biological Systems. 2009.1.22-23. 大阪
17. Toshiya Endo: Complex pathways and machineries for mitochondrial protein import. International Symposium Molecular Machines in Protein Folding and Translocation. 2007.5.23-25. Munich. Germany
18. Toshiya Endo: Functional network of mitochondrial translocator complexes. GRC Protein Transport Across Cell Membranes. 2007.6.10-15. Il Ciosso, Italy
19. Toshiya Endo: Pathways and machineries for mitochondrial protein import in yeast. XXII International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology Symposium Compartmentation of Cellular Activities. 2007.7.1-6. Melbourne, Australia
20. Toshiya Endo: How protein import motors function in mitochondrial protein import. FASEB Summer Research Conference : Assembly of the Mitochondrial Respiratory

- Chain. 2007.8.5-10. Tucson, Arizona, USA
21. 遠藤斗志也: ミトコンドリアへのタンパク質移行の経路と装置. 第40回日本発生活物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会 シンポジウム「細胞内輸送とオルガネラ」. 2007.5.28-30. 福岡
  22. 遠藤斗志也: タンパク質から学ぶ細胞内構造の構築原理. 科学技術未来戦略ワークショップ 階層的自己組織化のバイオナノテク. 2007.6.22-23. 東京
  23. 遠藤斗志也: ミトコンドリアタンパク質の交通とその制御. 第19回高遠・分子細胞生物学シンポジウム:シグナルと細胞組織調節. 2007.8.23-24. 伊那
  24. 遠藤斗志也: ミトコンドリアタンパク質の交通と膜透過装置. 第19回日本生化学会近畿支部シンポジウム「ミトコンドリアとレドックス科学の新展開」. 2007.9.15. 大阪
  25. 遠藤斗志也: ミトコンドリアタンパク質輸送システムの品質管理. BMB2007 ワークショップ「タンパク質の品質管理とオルガネラダイナミクス」. 2007.12.11-15. 横浜
  26. 遠藤斗志也: ミトコンドリア膜を舞台とするタンパク質の交通. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質の膜透過と膜挿入の分子メカニズム - その核心に迫る」. 2008.1.24-25. 大阪
  27. 遠藤斗志也: タンパク質の一生とタンパク質社会:ミトコンドリアタンパク質の交通と小胞体におけるタンパク質品質管理. 島根大学医学部医学部長セミナー. 2008.2.22. 出雲
  28. 遠藤斗志也: タンパク質の交通を管制するトランスロケータシステム. 第6回蛋白質科学会年会ワークショップ「蛋白質社会学:蛋白質の一生をケアする細胞内システム」. 2006.4.24-26. 京都
  29. 遠藤斗志也: 細胞内タンパク質の交通管制システム. 第3回バイオサイエンスの最先端 (インビトロジェンシンポジウム) . 2006.8.31-9.1. 神奈川
  30. Toshiya Endo: Mitochondrial protein translocators as protein nano-machines. EMBO Conference, Protein transport systems: protein targeting and translocation. 2006.9.30-10.5. Gdansk, Poland
  31. Toshiya Endo: Towards understanding mitochondrial protein traffic in yeast. International Symposium 'Milestones in the Life of Proteins' . 2007.3.15-16. 京都

[図書] (計6件)

1. 遠藤斗志也, 西川周一 (2009) 第8章 タンパク質の一生:誕生から死まで. 医学のための細胞生物学 (永田和宏, 塩田浩平

編) pp83-96. 南山堂

2. T. Endo (2009) Control and alteration of protein traffic in the cell. In System Biology – The Challenge of Complexity (eds, S. Nakanishi, R. Kageyama, and D. Watanabe), pp129-134. Elsevier Science, Amsterdam
3. 遠藤斗志也, 吉久徹, 森和俊, 田口英樹 (2007) 研究の歴史: 渾沌の前史から「タンパク質の一生」研究が開花するまで. タンパク質の一生: 集中マスター (遠藤斗志也, 森和俊, 田口英樹編) pp12-23, 羊土社
4. 遠藤斗志也, 吉久徹, 森和俊, 田口英樹 (2007) ブレイクスルーとなった実験法を中心に: そのとき「タンパク質の一生」研究の歴史が動いた. タンパク質の一生: 集中マスター (遠藤斗志也, 森和俊, 田口英樹編) pp25-35, 羊土社
5. 遠藤斗志也 (2007) グローバル・コード: 交通管制という問題. タンパク質の一生: 集中マスター (遠藤斗志也, 森和俊, 田口英樹編) pp58-66, 羊土社
6. 遠藤斗志也: トランスロコンはどうやって組立てられるのか. タンパク質の一生: 集中マスター (遠藤斗志也, 森和俊, 田口英樹編) p130, 羊土社

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://biochem.chem.nagoya-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者

遠藤斗志也 (ENDO TOSHIYA)  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：70152014

(2) 研究分担者

吉久 徹 (YOSHIHISA TOHRU) 2006-2007 年度  
のみ

名古屋大学・物質理学国際研究センター・准  
教授

研究者番号：60212312

西川周一 (NISHIKAWA SHUH-ICHI) 2006-2007  
年度のみ

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10252222

(3) 連携研究者

吉久 徹 (YOSHIHISA TOHRU) 2008-2009 年度  
のみ

名古屋大学・物質理学国際研究センター・准  
教授

研究者番号：60212312

西川周一 (NISHIKAWA SHUH-ICHI) 2008-2009  
年度のみ

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：10252222