

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22227003

研究課題名(和文)ミトコンドリア膜を舞台としたタンパク質の交通管制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of the control of protein trafficking at mitochondrial membranes

研究代表者

遠藤 斗志也 (ENDO, Toshiya)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70152014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 162,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアにタンパク質を適切に配送する交通管制システムについて、脂質の交通も含めた大きなフレームワークで作動機構の解明を目指した。部位特異的光架橋で外膜トランスロケータTOM複合体の各サブユニット間、前駆体との相互作用をマッピングして複合体の動的全体構造を明らかにした。ミトコンドリア上でSTOPコドンに欠いたmRNAに由来する新生鎖がトランスロケータの孔を詰まらせる事態を回避する仕組みを見出した。ミトコンドリア内膜のTam41がカルジオリピン合成の鍵酵素であることを明らかにし、外膜と内膜の間でホスファチジン酸を輸送するUps1-Mdm35について構造を決定し、輸送メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The protein trafficking as well as lipid trafficking systems at mitochondrial membranes were analyzed to elucidate the mechanisms of their functions. By using site-specific photocrosslinking, the outer membrane translocator TOM complex was analyzed for its inter-subunit and subunit-precursor interactions and the dynamic assembly structures were revealed. Cellular mechanisms to clear the mitochondrial translocon clogged by non-stop proteins arising from mRNA lacking a stop codon were revealed. Tam41 at the mitochondrial inner membrane was found to be a key enzyme for the cardiolipin synthetic pathway and the mechanism of phosphatidic acid transport between the outer and inner membranes by Ups1-Mdm35 was elucidated by determination of its high-resolution structures with and without a phosphatidic acid.

研究分野：構造生物学及び分子細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 酵母 トランスロケータ 膜透過 部位特異的光架橋 ERMES 脂質輸送 TOM複合体

1. 研究開始当初の背景

酵母ミトコンドリアには、1000種類を超えるタンパク質を適切に配送する交通管制システムが存在する。最近、ミトコンドリアの膜構造、レドックス、脂質とミトコンドリアタンパク質の交通に関する新発見等が相次ぎ、ミトコンドリアタンパク質の交通をめぐる概念が大きく書き換えられつつある。

2. 研究の目的

これまでの研究を進展させ、ミトコンドリアの膜構造や脂質、レドックス状態、小胞体など他のオルガネラとの関係を含む大きなフレームで、ミトコンドリアタンパク質の交通管制の問題に取り組む。膜を舞台とした、壮大なミトコンドリアタンパク質の交通管制システムの全体像を脂質の合成や交通も取り込んで解明することにより、細胞機能と細胞内構造の関係に関わる新たなパラダイム発見への道を開きたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア-小胞体接合複合体 (ERMES) の関連因子の検索と構造決定を目指す。(2) ミトコンドリア外膜-内膜融合部位 (コンタクトサイト) について、構成因子の検索と同定を目指す。(3) トランスロケータと呼吸鎖複合体の相互作用の実態と意義を解明する。(4) Tom22 のアセンブリー過程で *in vivo* 架橋される因子を足がかりに、新経路と関与する因子の検索を行う。(5) 脂質と交通というホットな問題に関して、メンテナンス因子 Tam41 を足がかりとして、小胞体-ミトコンドリアにまたがる脂質合成-配送システムの解明に挑む。(6) ミトコンドリア膜間部のレドックス制御システムの構成因子の構造決定と機能解明を目指す。(7) 膜貫通因子を含む、トランスロケータというマシナリーの構造決定にチャレンジする。

4. 研究成果

(1) ERMES と TOB 複合体間を移動する Mdm10 の機能 TOB 複合体には ERMES 構成サブユニットの Mdm10 が常時出入りしており、TOM40 複合体のサブユニット Tom7 が、この出入りの平衡を決めていること、そのことで生合成された Tom40 が他のサブユニットとアセンブリーするために TOB 複合体から出ていくタイミングを決めることを見いだした。アセンブリー時に複雑な膜タンパク質複合体の品質を保証する新たな仕組みと考えられる。

(2) 外膜トランスロケータの作動時のサブユニット間相互作用のスナップショット 部位特異的光架橋法により、TOM40 複合体中の Tom22 と近傍タンパク質との相互作用をマッピングした。さらに基質である前駆体を TOM40 複合体に蓄積させ、Tom22、Tom20、Tim50 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。この結果に

基づき、Tom22 と Tom20 が協力してプレ配列を認識する仕組み、Tom22 から内膜トランスロケータ Tim50 に前駆体プレ配列が引き渡される仕組みを明らかにした。

(3) TOM 複合体の動的アセンブリー構造の決定 *in vivo* 部位特異的光架橋法により、TOM 複合体でタンパク質の通り道となる Tom40 と他のタンパク質、および TOM 複合体を通過中の前駆体タンパク質との精密な相互作用地図を作成することに成功した。この相互作用地図から、Tom40 がつくる円筒状 (βバレル) 構造の孔を前駆体タンパク質が通ること、この孔の内側には通過するタンパク質の性質に応じてカスタマイズされた通り道が複数用意されていること、Tom40 の孔の出口には、通過してきた前駆体タンパク質を受け取るシャペロンタンパク質を集める仕掛けがあることが分かった。さらに TOM 複合体には 3 分子の Tom40 から成る孔が 3 つの完成型 (機能複合体) と、2 分子の Tom40 から成る孔が 2 つの準備型 (Tom40 組み込み用複合体) という 2 つの状態があり、それらの状態を往き来することで、常に新しい Tom40 を TOM 複合体に組み込み、正常機能を維持できることが明らかになった。

(4) Tom22 のアセンブリーに関わる因子の同定 *in vivo* 部位特異的光架橋法により、Tom22 を酵母細胞内で過剰発現すると、TOM40 複合体に組み込まれる前に一過的に架橋産物を生ずることを見出した。架橋相手のうちサイトゾルの因子は Hsp70 分子シャペロンであり、2 種類の外膜の因子のうち一つは外膜のポリン (Por1) であった。Por1 は TOB 複合体を介した Tom22 のアセンブリーに関わることが考えられる。

(5) ミトコンドリアの N-アンカー型膜タンパク質の新規輸送経路の発見 ミトコンドリアの N-アンカー型膜タンパク質 Om45 はこれまでその N 端側膜貫通配列を介して外膜にサイトゾル側から組み込まれると考えられていたが、膜間部側から外膜に組み込まれる膜トポロジーを有することを見出した。Om45 はまず内膜の TIM23 複合体と内膜膜電位の働きにより、外膜 TOM 複合体のチャンネルを完全に透過し、その後膜間部側から外膜に組み込まれるという、まったく新しい経路を使って外膜に組み込まれることが分かった。

(6) ミトコンドリア内膜タンパク質 Tam41 がカルジオリピン合成の鍵酵素であることを発見 ミトコンドリア内膜で合成されるカルジオリピンはミトコンドリアに特有のリン脂質であり、ミトコンドリア内膜のタンパク質複合体の機能に必須である。ここで鍵となる PA から CDP-DAG への変換酵素が当研究室で発見した Tam41 であることを見いだした。カルジオリピン合成経路の最後のミッシングリンクが同定されたことになる。

(7) ミトコンドリア膜間部のジスルフィド

リレーシステム構成因子の構造決定 ミトコンドリア膜間部でタンパク質に特異的にジスルフィド結合を導入する Tim40-Erv1 システムに関して、酵母 Erv1 のコア部分の二量体の X 線構造を分解能 2.0Å で決定した。この構造に基づき、コアの外にある N 端ループ部分(シャトルジスルフィドを含む)が Tim40 から Erv1 コア部分へと電子を伝達する仕組みを考察した。

(8) ノンストップミトコンドリアタンパク質の品質管理機構の解明 ミトコンドリアタンパク質の mRNA から終止コドンが失われると、できかけのタンパク質がリボソームをストールさせるとともに、ミトコンドリアのトランスロケータの孔も詰まらせてしまう。これは細胞にとって致死となること、Dom34/Hbs1 ができかけのタンパク質をストールしたりリボソームから強制的にミトコンドリア内に吐き出させ、孔詰まりを解消することを見いだした。これまで知られていなかった「できかけのタンパク質の品質管理」が細胞の正常機能を保つ上で重要であることを示す結果である。

(9) ERMES 構成因子の構造決定 小胞体膜とミトコンドリア外膜を物理的に接合する ERMES は、Mmm1, Mmm2, Mdm10, Mdm12 から成る。酵母 *K. lactis* の ERMES 構成因子、Mdm12 と Mmm1 を大腸菌に共発現させて精製し、Mdm12 の X 線構造を 2.3 Å の分解能で決定する事に成功した。Mdm12 には疎水性の大きな空間が外に向かって開いており、ここに未同定のリン脂質と思われる電子密度が見られた。界面活性剤で脂質を除去した Mdm12 についても X 線構造を決定した。疎水性ポケットの疎水性残基を親水性残基に置換すると酵母の増殖能に欠損が生じた。このことから Mdm12 が小胞体膜からミトコンドリア外膜へとリン脂質を輸送するキャリアとして働く可能性が強く示唆された。

(10) Mdm12-Mmm1 の in vitro 脂質輸送の証明 ERMES の構成因子 Mdm12-Mmm1 を大腸菌に発現させて精製し、in vitro でリボソーム間の脂質輸送能があることを証明した。同様の活性はリボソーム-ミトコンドリア間でも観察された。一方 Mdm10 単独の脂質輸送活性は低かった。したがって Mdm12 は Mmm1 と複合体をつくることで高い脂質輸送能を獲得することが示唆された。

(11) Ups1-Mdm35 の構造決定とミトコンドリアが外膜-内膜間での脂質輸送機構の解明 ミトコンドリア外膜から内膜へリン脂質(ホスファチジン酸)分子を輸送するタンパク質 Ups1-Mdm35 複合体の遊離型及びリン脂質結合型の立体構造を決定し、決定した立体構造とその変異体を用いた解析から、タンパク質 Ups1-Mdm35 複合体が、いったん「脂質膜」に結合してそこから運ぶべき脂質を引き抜き、次に「水中」を移動して目的地の「脂質膜」へと脂質を送り込むという、脂質輸送のメカニズムをはじめ

て解明した。

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 27 件)

1. T. Shiota, T. Endo et al. (17名, 17番目) Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science* 349 (6255), 1544-1548 (2015) doi: 10.1126/science.aac6428.
2. Y. Watanabe, Y. Tamura, T. Endo et al. (4名, 2, 4番目) Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria. *Nature Commun.* 6, Article number: 7922 (2015) doi: 10.1038/ncomms8922
3. Y. Tamura, T. Endo et al. (3名, 1, 3番目) Phospholipid transport via mitochondria. *Traffic* 15 (9), 933-945 (2014) doi: 10.1111/tra.12188
4. F. Koyano, Y. Tamura, T. Endo, et al. (16名, 4, 11番目) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162-166 (2014) doi: 10.1038/nature13392
5. J. Song, Y. Tamura, T. Endo et al. (4名, 2, 4番目) A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex. *EMBO Rep.* 15, 670-677 (2014) doi: 10.1002/embr.201338142
6. H. Okamoto, Y. Tamura, T. Endo et al. (5名, 4, 5番目) Intra-molecular disulfide bond of Tim22 maintains integrity of the TIM22 complex in the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 289, 4827-4838 (2014) doi: 10.1074/jbc.M113.543264
7. B. Rahman, T. Endo et al. (5名, 5番目) NMR analyses on the interactions of the yeast Tim50 C-terminal region with the presequence and Tim50 core domain. *FEBS Lett.* 588, 678-684 (2014) doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.037
8. Y. Tamura, T. Endo Unveiling the last missing link of the cardiolipin synthetic pathway in mitochondria. *Aging* 6, 392-393 (2013) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3824408/>
9. Y. Tamura, S. Nishikawa, T. Endo et al. (12名, 1, 3, 12番目) Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab.* 17, 709-718 (2013) doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.018
10. Y. Tamura, T. Endo, et al. (7名, 1, 4番目) Phosphatidylethanolamine biogenesis in mitochondria: phosphatidylserine (PS) trafficking is independent of a PS decarboxylase and intermembrane space

- proteins, Ups1p and Ups2p. *J. Biol. Chem.* 287, 43961-43971 (2012) doi: 10.1074/jbc.M112.390997
11. T. Shiota, Y. Tamura, T. Endo et al. (7名, 4, 7番目) The Tom40 assembly process probed using the attachment of different intra-mitochondrial sorting signals. *Mol. Biol. Cell* 23,3936-3947 (2012) doi: 10.1091/mbc.E12-03-0202
 12. T. Izawa, S. Nishikawa, T. Endo et al. (6名, 5, 6番目) Role of Dom34:Hbs1 in non-stop protein clearance for normal organelle protein influx. *Cell Reports* 2, 447-453 (2012) doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.010
 13. T. Izawa, T. Endo, and S. Nishikawa et al. (14名, 3, 4番目) Yos9p and Hrd1p mediate ER retention of misfolded proteins for ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* 23, 1283-1293 (2012) doi: 10.1091/mbc.E11-08-0722
 14. T. Shiota, T. Endo et al. (5名, 5番目) *In vivo* protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 15179-15183 (2011) doi: 10.1073/pnas.1105921108
 15. H. Yamamoto, T. Endo et al. (14名, 14番目) Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 91-96 (2011) doi: 10.1073/pnas.1014918108
 16. K. Yamano, T. Endo et al. (3名, 3番目) Tom7 regulates Mdm10-mediated assembly of the mitochondrial import channel protein Tom40. *J. Biol. Chem.* 285, 41222-41231 (2010) doi: 10.1074/jbc.M110.163238
 17. K. Yagawa, T. Endo et al. (8名, 8番目) Structural basis for unfolding pathway-dependent stability of proteins: vectorial unfolding vs. global unfolding. *Protein Sci.* 19, 693-702 (2010) doi: 10.1002/pro.346
- [学会発表](計 142 件)
1. Toshiya Endo, Protein import into mitochondria and the ER, Gordon Research Conference: Protein transport across cell membranes, 2016.3.6-11, Galveston, Texas, USA
 2. T. Endo, Machineries for transport of proteins and lipids for mitochondrial biogenesis. EMBO Conference on Mechanisms and regulation of protein translocation, 2015.3.21-25, Dubrovnik, Croatia
 3. T. Endo, Croslinking approaches in membrane biology. TAMPTing Seminar 3. 2015.3.16-18, Amsterdam, The Netherlands
 4. T. Endo, How the cell makes mitochondria from proteins and lipids. The KSU International Symposium: Cutting-edge of Life Sciences, 2014.5.30-31, 京都産業大学 (京都府京都市).
 5. T. Endo, How the cell makes mitochondria: from the viewpoints of transport of proteins and lipids. DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria - from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease. 2013.10.28-11.1, 沖縄残波岬ロイヤルホテル (沖縄県中頭郡)
 6. T. Endo, Transport, assembly, and quality control of mitochondrial proteins in yeast. Yeast 2013 (The 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology), 2013.8.29-9.3, Frankfurt, Germany
 7. T. Endo, New perspective on biogenesis of mitochondrial proteins and lipids. EMBO Conference: From Structure to Function of Translocation Machines, 2013.4.13-17, Dubrovnik, Croatia
 8. T. Endo, New perspective on import and maintenance of mitochondrial proteins. SFB594 3rd International Symposium Molecular Machines in Protein Folding and Translocation. Bavarian Academy of Sciences, 2012.7.23-25, Munich, Germany
 9. T. Endo, Structural aspects of the dynamic mitochondrial import systems. Gordon Research Conference on Protein transport across cell membranes. 2012.3.11-16, Galveston, USA
 10. T. Endo, Assembly of the TOM40 translocator complex in the mitochondrial outer membrane. JST-Vinnova Joint Workshop at BiWO2011, 2012.1.25, 産総研ゲノム情報研究センター (東京都江東区)
 11. T. Endo, Structural insight into mitochondrial protein traffic in the cell. Global COE International Symposium on Elucidation and Design of Materials, 2011.11.28-30, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
 12. T. Endo, Structural insight into the dynamic mitochondrial protein import pathways. EMBO Conference on protein transport systems structures, mechanisms, and medical aspects. 2011.4.16-20, Santa Margherita di Pula, Sardegna, Italy
 13. T. 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, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)
 14. T. 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

15. T. Endo, Structural aspects of import and assembly of mitochondrial proteins. The 3rd International Symposium on Protein Community. 2010.9.13-16, ホテル日航奈良 (奈良県奈良市).

〔図書〕(計 1 件)

1. T. Shiota, S. Nishikawa, T. Endo Analyses of protein-protein interactions by *in vivo* photocrosslinking in budding yeast in *Meth. Mol. Biol.* 1033 “Membrane Biogenesis” (eds. D. Rapaport, J. M. Herrmann), 207-217 (2013) doi: 10.1007/978-1-62703-487-6_14

〔その他〕

ホームページ等

<http://endolab.jp/wp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

遠藤 斗志也 (ENDO, Toshiya)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：70152014

(2)研究分担者

田村 康 (TAMURA, Yasushi)
山形大学・理学部・准教授
研究者番号：50631876
(平成 26 年度より研究分担者)

(3)連携研究者

西川 周一 (NISHIKAWA, Shuh-ichi)
新潟大学・理学部・教授
研究者番号：10252222