

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4年 6月 8日現在

機関番号 : 34304
研究種目 : 特別推進研究
研究期間 : 2015~2019
課題番号 : 15H05705
研究課題名 (和文) ミトコンドリア生合成を司る細胞内統合的ネットワークの解明
研究課題名 (英文) Elucidation of the integrated cellular network for mitochondrial biogenesis
研究代表者
遠藤 斗志也 (ENDO Toshiya)
京都産業大学・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 349,300 千円)

研究成果の概要 (和文) :

タンパク質のミトコンドリア内への配送を担う搬入口 TOM 複合体、外膜のβバレル型膜タンパク質の構造形成と膜への組込みを担う SAM 複合体のクライオ EM 構造を決定し、タンパク質交通の研究に新たなフェイズを開いた。ミトコンドリアだけでなく ER も連携する膜タンパク質の品質管理のあらたな機構を発見した。オルガネラ内、オルガネラ間の脂質交通をモニタリングし、オルガネラ間コンタクトを検索する系を確立し、細胞内脂質交通の解明に向けて貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存ミトコンドリアへのタンパク質や脂質の輸送はミトコンドリア生合成の中心的機構である。本研究により、構造生物学的視点および、他のオルガネラとの連携という視点から、ミトコンドリア生合成機構の根本的原理に迫ることができた。こうした原理解明により、ミトコンドリアの機能欠損や品質管理の低下に伴うパーキンソン病をはじめとするヒトの病気の治療法の開発や、ミトコンドリア膜へのタンパク質組込みの効率を制御することで老化を防ぐなどの可能性が開けることが期待される。

研究成果の概要 (英文) :

We determined the cryo-EM structures of the TOM complex, an import gate for mitochondrial proteins, and the SAM complex, a machinery for β-barrel protein folding and insertion into the outer membrane, which opened up a new phase in the study of cellular protein trafficking. We discovered a new quality control mechanism for mistargeted membrane proteins, which involves not only mitochondria but also the ER. We established experimental systems to monitor inter-organelle and intra-organelle lipid trafficking and to search for organelle contact sites, which contribute to the elucidation of cellular lipid trafficking.

研究分野 : 構造生物学、分子細胞生物学

キーワード : ミトコンドリア、タンパク質輸送、脂質輸送、オルガネラ、生体膜、コンタクトサイト、クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核細胞に必須のオルガネラで、好氣的 ATP 産生とともに様々な物質代謝・情報伝達を担い、アポトーシスにも関わる。近年ミトコンドリア機能と老化や健康、神経変性疾患をはじめとする様々な病態との関係も注目されている。ミトコンドリアの正常な構造と機能を維持するためには、不良ミトコンドリアを除去すると共に、常時ミトコンドリアを新たに作り出す必要がある。ミトコンドリアはゼロからは作られず、既存のミトコンドリアを拡大、分裂、分配することで増える。ミトコンドリアを拡大するためには、ミトコンドリアを構成するタンパク質（酵母では 800 種、ヒトでは 1500 種）と特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリアに合成・配送しなければならない。細胞内にはこうしたミトコンドリア生合成のためのタンパク質と脂質の合成・配送、それに伴う品質管理やオルガネラ間の機能調整を図る巧妙なネットワークが構築されている。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまで研究を進めてきたタンパク質の交通に、膜間における脂質の交通という視点を加えて、ミトコンドリアが細胞内でいかに作られるかという根源的問題の分子機構を統合的に理解することをめざした。具体的には、当初の背景に基づいて、以下の問題の解明をめざした。(P1) 外膜トランスロケータの構造と機能、(P2) 酵母細胞への PINK1-Parkin システムの移植、(P3) オルガネラ膜上でのノンストップ (NS) タンパク質の品質管理、(P4) Msp1 による外膜タンパク質の品質管理、(L1) *in vitro* 脂質輸送アッセイ系の確立、(L2) ERMES 複合体による ER-ミトコンドリア間脂質輸送機構、(L3) ミトコンドリアと他のオルガネラ間コンタクト部位の探索、(L4) ミトコンドリア外膜-内膜間の脂質輸送機構、(L5) ERMES クラスターリングの調節機構、(L6) *in vivo* での脂質輸送モニタリング系の確立。

3. 研究の方法

(P1~P4) **タンパク質の交通**: 外膜のトランスロケータの TOM 複合体と SAM 複合体について、クライオ電子顕微鏡 (EM) 構造の決定を行い、決定された構造に基づき機能解析を行った。ラテラル開閉については、モデルタンパク質が TOM 複合体からラテラルリリースされるかどうかを検討した。様々な膜トポロジーの ER 膜タンパク質についてストップコドン除去した NS タンパク質を作製し、その品質管理機構について、増殖阻害を指標として検討した。Msp1 による誤配送外膜タンパク質の品質管理が細胞内のどこでどのような因子に依存して起こるのか、品質管理は分解だけなのか、配送のやり直しを伴うのかを検討した。

(L1~L6) **脂質の交通**: 単離したミトコンドリア+ER 膜を用いて、脂質輸送アッセイ系の最適化を行った。決定した Mdm12 の精密構造に基づいて変異体を作製、加えて単離 Mdm12-Mmm1 を用いた *in vitro* 脂質輸送活性の検討を行った。オルガネラ間コンタクトサイトを Split-GFP を用いて可視化する実験系を構築した。Mdm35 が Ups1、Ups2 と協力して外膜-内膜間の脂質輸送をどのように制御・調節するかを解明した。ERMES 複合体のクラスターリングを調節する因子の探索、ER ストレスとクラスターリングの関係を解析した。脂質合成酵素を欠損する酵母細胞内の各オルガネラに合成酵素を異所発現することで、脂質輸送を検出する系を構築した。

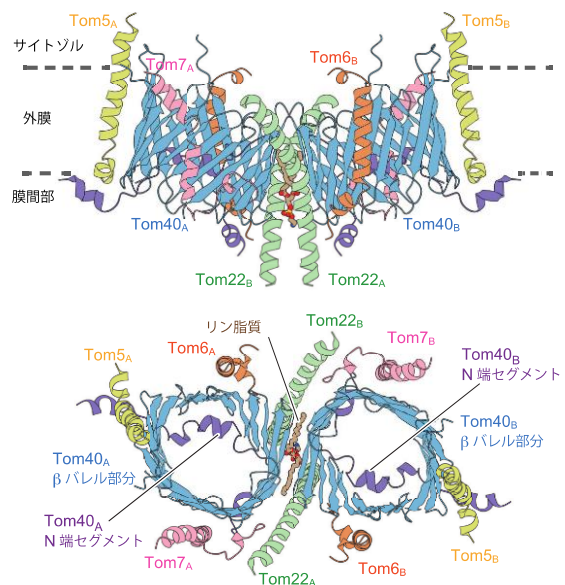
4. 研究成果

【タンパク質の交通】(P1~P4)

TOM 複合体の構造と機能: クライオ EM+単粒子解析により、出芽酵母の TOM 複合体のクライオ EM 精密構造を決定した (Araiso et al., *Nature* 2019)。得られた構造から、タンパク質の膜透過チャンネル内に、プレ配列を持つ前駆体タンパク質と持たない前駆体タンパク質専用の通り道と出口を別々に用意し、出口で待ち構える各輸送経路の下流の因子に前駆体タンパク質を受け渡すことで、性質も機能も異なる 1000 種に及ぶ前駆体タンパク質の外膜透過を効率良く行うことが明らかとなった。ミトコンドリアのトランスロケータ複合体の精密構造は 30 年以上にわたりその解明が待たれていたが、ついにこの研究で実現し、トランスロケータの構造機能研究は新たなフェイズに突入することとなった。

TOM 複合体のアセンブリー構造: TOM 複合体の 3 量体から 2 量体への変換時に解離する Tom22 は、

Por1 (VDAC の酵母ホモログ) により安定化することを見いだした。2 量体は一部の前駆体 (膜間部の MIA 経路の基質) 専用のトラ



ンスロケータとして機能すること、2 量体-3 量体平衡とそれともなう Por1 による Tom22 の安定化は細胞周期とも関係することがわかった (Sakaue et al., *Mol. Cell* 2019)。TOM 複合体が動的にそのサブユニットを入れ替え、アセンブリー状態を変えることで多様な基質に対応するというモデルは、トランスロケータの構造機能の理解を大きく転換させるものとなった。

SAM 複合体の構造解析：外膜のもう一つのトランスロケータ SAM 複合体について、構成サブユニット (タンパク質) が異なる二つの複合体について、高分解能立体構造を決定することに成功した (Takeda et al., *Nature* 2021)。そして、SAM 複合体がプレースホルダーとしての構成タンパク質 (Sam50 と Mdm10) および基質の β バレルタンパク質を入れ替えながら、基質のバレル構造形成を促し、外膜に組み込む新規の仕組み (β バレルスイッチモデル) を明らかにした。 β バレル型膜タンパク質の構造形成と膜への組み込みという、膜タンパク質合成に関する基本原理の理解を大きく進める、インパクトのある結果となった。

TOM 複合体チャンネルのラテラル開閉：外膜の N アンカー膜タンパク質のうち C 端ドメインがサイトゾル側にあるものは、TOM 複合体を介した外膜透過が TM 配列で停止し、膜透過チャンネルである Tom40 の β バレル構造がラテラル (膜面) 方向に開いて TM 配列が外膜に挿入されるメカニズムが考えられる。この機構について、モデルタンパク質を使って *in vitro* および *in vivo* で解析を行い、ラテラルに開く可能性が高いことを見いだした (投稿準備中)。

Msp1 による外膜タンパク質の品質管理：ミトコンドリア外膜の Msp1 は、ミトコンドリア外膜に誤配送されたテイルアンカー (TA) タンパク質を除去する。今回、ミトコンドリア外膜に誤配送された基質は Msp1 により引き抜かれ、ER に送り込まれた後、ER 上で Doa10 複合体によりユビキチン化され、Cdc48 により ER 膜から引き抜かれてプロテアソームで分解されることを明らかにした (Matsumoto et al., *Mol. Cell* 2019)。Msp1 による誤配送タンパク質の品質管理は、ヒトホモログの ATAD1 の欠損が病態と関連することもあってホットな分野となっている。私たちは複数のプロモーターによって Msp1 と基質の発現のタイミングを制御してケイ光顕微鏡によるタイムラプス観察を行うことで、オルガネラ間のタンパク質移動を証明することに成功し、この分野の研究をリードすることとなった。

【脂質の交通】(L1~L6)

***in vitro* 脂質輸送アッセイ系の確立**：出芽酵母から単離した膜画分を用いて、ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送を評価できる実験系の確立に成功した (Kojima et al., *Sci. Rep.* 2016)。この実験系を用いて、ERMES 複合体がこれらオルガネラ間におけるリン脂質輸送に重要な役割を果たすことを明らかにした。この分野の研究に欠けていたオルガネラ間脂質移動の信頼できる検出法の確立ということで、重要な貢献をすることとなった。

ERMES 複合体による ER-ミトコンドリア間脂質輸送機構：ER-ミトコンドリア間コンタクト部位をつくる ERMES のサブユニット Mdm12 と脂質の複合体の構造を決定した (Kawano et al., *JCB* 2018)。ERMES において、Mdm12-Mmm1 は脂質輸送の最小機能ユニットであり、Mdm12 と Mmm1 が重要な役割を果たすことが分かった。ERMES が ER-ミトコンドリア間で脂質輸送を担うかどうかについては、当時論争があったが、本研究により脂質輸送を担うことが確立し、論争に決着をつけることができた。一方でヒトでは VAT-1 という可溶性タンパク質も ER-ミトコンドリア間の脂質輸送を担うことが示唆されている。今回 VAT-1 の精密構造を X 線結晶解析により決定した (Watanabe et al., *JBC* 2020)。

ミトコンドリアと他のオルガネラ間コンタクト部位の探索：ミトコンドリアと他のオルガネラ間のコンタクト部位を探索するために、オルガネラ間コンタクト部位を Split-GFP を用いて可視化する実験系を構築した。この実験系を用いることで、ミトコンドリアと ER、液胞、ペルオキシソーム、脂肪滴とのコンタクトサイトが存在することが示唆された (Kakimoto et al., *Sci. Rep.* 2018)。オルガネラ間コンタクト部位の検索はきわめてホットな研究分野で、関与する因子の検索についても激しい競争が繰り広げられている。信頼できる結果を得るには、コンタクト部位を検出する手法がコンタクト部位を人為的に形成してしまうアーティファクトを最小限に留めることが重要であるが、ここで開発した手法はきわめて信頼性が高い手法といえる。

ERMES クラスタリングの調節機構：ERMES のクラスタリングを調節する因子を探索した結果、ミトコンドリアの融合と分裂がアンタゴニスティックに ERMES の会合を制御することを見出した。ERMES 複合体同士は会合しやすい性質を持ち、適度にミトコンドリアを分裂させて ERMES 複合体が接触する機会を抑制することで、ERMES の会合を調節していると考えられる (Kojima et al., *Cell Rep.* 2019)。ERMES のクラスタリングに積極的な調節機構と機能があるかどうかは未解明の問題であり、今後のこの問題解明への突破口になることが期待される。

***in vivo* での脂質輸送モニタリング系の確立**：酵母のホスファチジルセリン (PS) 合成酵素 Cho1 を欠損する株の様々なオルガネラ膜区画に、大腸菌の可溶性 PS 合成酵素 PssA を発現・異所局在させることで、*in vivo* で様々なオルガネラ間のリン脂質輸送を評価する実験系を確立した (Shiino et al., *FEBS J.* 2021)。この実験系により、これまで謎であった、ペルオキシソームや脂肪滴からミトコンドリアへの PS 輸送や、ミトコンドリア内膜のマトリクス側から膜間部側への PS のフロップ拡散を測定することが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 46 件, うち査読付論文 38 件/うち国際共著 5 件) 研究開始が 2015 年度なので 2015 年に発表した論文は除いた。

Takeda H, Tsutsumi A, Nishizawa T, Lindau C, Busto JV, Wenz L-S, Ellenrieder L, Imai K, Straub SP, Mossmann W, Qiu J, Yamamori Y, Tomii K, Suzuki J, Murata T, Ogasawara S, Nureki O, Becker T, Pfanner N, Wiedemann N, Kikkawa M, Endo T* Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by β -barrel switching. *Nature* 590, 163-169 (2021). doi: 10.1038/s41586-020-03113-7

Shiino H, Furuta S, Kojima R, Kimura K, Endo T, Tamura Y* Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA. *FEBS J.* 288, 3285-3299 (2021). doi: 10.1111/febs.15657

Watanabe Y, Tamura Y, Kakuta C, Watanabe S, Endo T* Structural basis for inter-organelle phospholipid transport mediated by VAT-1. *J Biol Chem.* 295, 3257-3268 (2020). doi: 10.1074/jbc.RA119.011019

Araiso Y, Tsutsumi A, Qiu J, Imai K, Shiota T, Song J, Lindau C, Wenz L-S, Sakaue H, Yunoki K, Kawano S, Suzuki J, Wischnewski M, Schütze C, Ariyama H, Ando T, Becker T, Lithgow T, Wiedemann N, Pfanner N, Kikkawa M, Endo T* Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. *Nature* 575, 395-401 (2019). doi:10.1038/s41586-019-1680-7

Matsumoto S, Nakatsukasa K, Kakuta C, Tamura Y, Esaki M, Endo T* Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. *Mol. Cell* 76, 191-205 (2019). doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.006

Sakaue H, Shiota T, Ishizaka N, Kawano S, Tamura Y, Tan KS, Imai K, Motonon C, Hirokawa T, Taki K, Miyata N, Kuge O, Lithgow T, Endo T* Porin associates with Tom22 to regulate the mitochondrial protein gate assembly. *Mol Cell.* 73, 1044-1055 (2019). doi:10.1016/j.molcel.2019.01.003.

Kojima R, Kakimoto Y, Furuta S, Itoh K, Sesaki H, Endo T, Tamura Y* Maintenance of cardiolipin and crista structure requires cooperative functions of mitochondrial dynamics and phospholipid transport. *Cell Rep.* 26(3):518-528.e6 (2019) doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.07

Kakimoto Y, Tashiro S, Kojima R, Morozumi Y, Endo T, Tamura Y* Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci. Rep.* 8, 6175 (2018) doi: 10.1038/s41598-018-24466-0

Kawano S, Tamura Y, Kojima R, Bala S, Asai E, Michel A.H, Kornmann B, Riezman I, Riezman H, Sakae Y, Okamoto Y, Endo T* Structure-function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1-Mdm12 of ERMES. *J. Cell Biol.* 217, 959-974 (2018). doi: 10.1083/jcb.201704119

Kojima R, Endo T, Tamura Y* A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed *in vitro*. *Sci. Rep.* 6, Article number 20777 (2016). doi:10.1038/srep30777

他 36 件

〔学会発表〕(計 147 件) (うち招待講演 54 件/うち国際学会 29 件) 研究開始が 2015 年度なので 2015 年の発表は除いた。

〔図書〕(計 1 件)

竹田弘法, 荒磯裕平, 遠藤斗志也 ミトコンドリアへのタンパク質搬入口と膜組み込み装置の構造生物学~TOM 複合体と SAM 複合体のクライオ電子顕微鏡構造
in 「ミトコンドリアダイナミクス~機能研究から疾患・老化まで」(NTS, 全 458 頁) 第 1 編, 第 7 章, 第 1 節 pp197-202 (2021)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ <http://www.endolab.jp/wp/>

フェイスブック <https://www.facebook.com/endo.lab>

ツイッター <https://twitter.com/endolabksu>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 田村 康

ローマ字氏名: TAMURA Yasushi

所属研究機関名: 山形大学

部局名: 理学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 50631876