

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 the integrated cellular  
network for mitochondrial biogenesis**

課題番号：15H05705

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



**研究の概要：**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。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加えて、最近開始した、膜間における脂質の交通という視点を強化、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す。

**研究分野：**構造生物化学

**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

**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加えて、最近開始した、膜間における脂質の交通という視点を強化、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ている。

**3. 研究の方法**

(P1) 外膜トランスロケーターの構造と機能 (TOM複合体の構造と機能, TOM複合体チャネルのラテラル開閉), (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。

**4. これまでの成果（論文発表したもの）**

(1) 外膜のタンパク質膜透過装置 TOM 複合体について、構成タンパク質がどのように集合して複合体をつくり、どのように前駆体タンパク質を効率よく膜透過させるかについて、部位特異的光架橋法により、詳細な解析を行った。複合体の中心因子 Tom40 がつくる円筒構造の内側は、前駆体タンパク質が外膜を透過するための通り道として機能し、異なるタイプの前駆体ごとに、別々に最適化された通り道が用意されていた。孔の出口には膜間部のシャペロンが集められて、疎水性の基質タンパク質を効率よくシャペロンに受け渡していることが分かった。さらに TOM 複合体には Tom40 から成る孔が3つの完成型と、孔が2つの準備型の2つの状態があり、それらを可逆的に変換することで新しい Tom40 を古い Tom40 と入れ替え、完全な機能をもつ複合体を維持している可能性が示唆された（論文 8）。

(2) mRNA から終止コドンが欠くことで生じるノンストップタンパク質について、ER 膜とミトコンドリア外膜における品質管理の解析をすすめる、その一部を論文発表した。特に ER

#### 〔4. これまでの成果 (続き)〕

膜タンパク質においては、ノンストップ膜タンパク質の膜トポロジーに応じて、オルガネラ内の可溶性タンパク質と同じ品質管理を受ける場合とサイトゾルタンパク質と同じ品質管理を受ける場合に分類できることが明らかになった (論文4)。

(3) 酵母細胞から単離したミトコンドリア-ER 膜画分を用いて、*in vitro*でERからミトコンドリアへのホスファチジルセリン (PS) 輸送とミトコンドリアからERへのホスファチジエタノールアミン (PE) 輸送をモニターするアッセイ系を確立した。この系を用いてミトコンドリア-ER間コンタクトを形成するERMESがPS輸送には関わるがPE輸送には関わらないことを見出した (論文5)。

(4) 既存のオルガネラ間コンタクトにできるだけ影響を与えることなく、オルガネラ間コンタクト部位を可視化できるシステムを開発した。Split-GFP断片を異なる2種類のオルガネラ間に標的化させ、異なるオルガネラ同士が近接する場所でのみGFP分子が再構成することにより、オルガネラコンタクト部位の可視化を試みた。様々な条件検討の結果、Split-GFPが様々なオルガネラ (ER, ミトコンドリア, 液胞, ペルオキシソーム, 脂肪滴) 間のコンタクト部位の可視化に有効であることを、出芽酵母およびヒトHeLa細胞を用いて示した (論文1)。

(5) ミトコンドリアの外膜と内膜の間でホスファチジン酸 (PA) を輸送するUps1-Mdm35についてX線構造を決定し、疎水性ポケットとその蓋として機能する $\Omega$ ループの重要性を見いだした。Mdm35の解離にUps1の膜結合能の増加と合わせて、Ups1-Mdm35による脂質輸送の分子機構を解明した。Ups1-Mdm35のホモログUps2-Mdm35についても解析を行い、ミトコンドリア外膜と内膜の間でホスファチジルセリンを輸送することを見だし、論文として発表した (論文9)。

#### 5. 今後の計画

(1) タンパク質の交通: TOM複合体の3量体-2量体平衡の意義, TOM複合体からのラテラルリリースの検証, ミトコンドリア上でのNSタンパク質の品質管理, Msp1と共同して働く因子の検証等, これまでの研究を継続する。30~31年度はCREST研究の成果とリソースを引き継ぎ構造生物学研究にも重点をおく。

(2) ERMESによる脂質輸送機構の解明と可溶性VAT-1によるER-ミトコンドリア間脂質輸送の解明, オルガネラ間コンタクト因子とその制御因子の探索, ERMESクラスター制御のメカニズム解明を進める。

#### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下

線、連携研究者は点線)

(1) Y. Kakimoto, S. Tashiro, R. Kojima, Y. Morozumi, T. Endo, and Y. Tamura, Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system. *Sci. Rep.* 8, 6175 (2018)

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

(3) R. Kojima, S. Kajiura, H. Sesaki, T. Endo, and Y. Tamura, Identification of multi-copy suppressors for endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 590, 3061-3070 (2016)

(4) S. Arakawa, K. Yunoki, T. Izawa, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo, Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol. *Sci. Rep.* 6, 30795 (2016)

(5) R. Kojima, T. Endo, and Y. Tamura, A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed *in vitro*. *Sci. Rep.* 6, 20777 (2016)

(6) T. Jores, A. Klinger, L. E. Groß, S. Kawano, N. Flinner, E. Duchardt-Ferner, J. Wöhnert, H. Kalbacher, T. Endo, E. Schleiff, and D. Rapaport, Characterization of the targeting signal in mitochondrial  $\beta$ -barrel proteins. *Nature Commun.* 7, 12036 (2016)

(7) N. Miyata, Y. Watanabe, Y. Tamura, T. Endo, and O. Kuge, Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria. *J. Cell Biol.* 214, 77-88 (2016)

(8) T. Shiota, K. Imai, J. Qiu, V. L. Hewitt, K. Tan, H. Shen, N. Sakiyama, Y. Fukasawa, S. Hayat, M. Kamiya, A. Elofsson, K. Tomii, P. Horton, N. Wiedemann, N. Pfanner, T. Lithgow, and T. Endo, Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. *Science* 349 (6255), 1544-1548 (2015)

(9) Y. Watanabe, Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo, Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria. *Nature Commun.* 6, 7922 (2015)

(10) 2016年4月平成29年度文部科学大臣表彰 (科学技術賞研究部門)

ホームページ等 <http://endolab.jp/wp/>