

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間	：2020年度～2024年度
課題番号	：20H05689
研究課題名	：ミトコンドリアの生合成と機能維持を担うタンパク質交通システムの分子基盤
研究代表者氏名（ローマ字）	：遠藤 斗志也（ENDO Toshiya）
所属研究機関・部局・職	：京都産業大学・生命科学部・教授
研究者番号	：70152014

研究の概要：

ミトコンドリアがタンパク質の交通と品質管理によって作られ、維持される仕組みを統合的に理解するために、酵母を用いて、構造生物学的手法と生化学・細胞生物学的手法を組み合わせる研究を進めている。特にミトコンドリアのトランスロケータである TOM 複合体と SAM 複合体の動的作動機構の解明、外膜の誤配送・異常タンパク質の品質管理、ミトコンドリアを拡大する新経路の探索に取り組んでいる。

研究分野：構造生物化学

キーワード：ミトコンドリア、TOM 複合体、SAM 複合体、クライオ電子顕微鏡、ポリリン、タンパク質輸送、トランスロケータ

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、真核生物の細胞でエネルギー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。ミトコンドリアを細胞内で作り維持するには、ミトコンドリアを構成する 1000 種あまりのタンパク質をサイトゾルから既存ミトコンドリアに配送すること、ミトコンドリア内の不良タンパク質を随時検出・除去することが必須である。研究代表者らは、タンパク質の配送システムは関与する装置（トランスロケータ）の構成成分の再編成を伴う動的変換により制御されること、ミトコンドリアタンパク質の品質管理システムは単なる分解系ではなく、ER も巻き込んだタンパク質配送のやりなおし（校正）機構として働くことを見出した。

2. 研究の目的

本研究では代表者らのこれまでの発見を足掛かりとして、出芽酵母を中心にミトコンドリアの交通システムと品質管理システムについて、クライオ電子顕微鏡（EM）による構造解析と構造に基づく生化学的・細胞生物学的解析を一気に進め、タンパク質の交通と品質管理に関する新たな原理を確立する。さらにこれまで不明であったミトコンドリア拡大を促す因子の探索を行う。これらの研究を通じて、ミトコンドリアが細胞内でいかに作られ、維持されるかという根源的問題の分子機構の統合的理解をめざす。

3. 研究の方法

本研究で明らかにする「問い」は以下の通りである。(1) 外膜トランスロケータの TOM 複合体は、どのようにして 1000 種類におよぶ多様な基質を間違いなく選別し、膜透過させるのか、(2) 外膜トランスロケータの SAM 複合体はどのように基質のβバレル構造形成を促しつつ外膜への組み込みを実現するのか、(3) ミトコンドリア上に蓄積する誤配送タンパク質や不良タンパク質は、Msp1、Ubx2 などのミトコンドリア上の品質管理システムによってどのように認識され、処理されるのか、(4) 細胞の内外からの要請に応じてミトコンドリア量の増加を制御する因子と経路は何か。これらの問いに答えるために、トランスロケータの精密構造解析、機能解析を展開し、*in vivo*、*in vitro* の生化学的、細胞生物学的解析、出芽酵母の利点を生かした分子遺伝学的選別と解析を進めている。

4. これまでの成果

(1) TOM 複合体の動的平衡の分子基盤

ミトコンドリアへのタンパク質の搬入口として働く外膜のトランスロケータ TOM 複合体は 3 分子の Tom40 を 3 分子の Tom22 が糊付けする形の 3 量体と、2 分子の Tom40 から成り Tom22 を欠く 2 量体が動的平衡にある。動的平衡にある 2 量体は膜間部の可溶性タンパク質、3 量体はそれ以外の大部分の前駆体を基質として膜透過させる。すなわちトランスロケータとしての TOM 複合体はサブユニット組成を動的に変えることで多様な基質に対応して働くが、このモデルの根拠は 2 量体を安定化させるポリリンを欠損すると、2 量体の基質のミトコンドリアへの取り込みが阻害されるという実験結果であった。しかしポリリンには小分子やイオンのチャネルとしての機能があるので、チャネル機能の阻害の二次的影響の可能性を排除できなかった。そこで今回、チャネル活性を保持するが 2 量体安定化機能に欠損のあるポリリン変異体の取得に成功した。この変異体はミトコンドリアの呼吸活性には影響を与えない一方、TOM 複合体の動的平

衡には影響を与え、2量体の基質のミトコンドリアへの取り込みが阻害された。以上の結果から TOM 複合体の基質特異性が 3 量体-2 量体の動的平衡により制御されるというモデルが正しいことが証明された。

(2) SAM 複合体の精密構造と作動機構

ミトコンドリア外膜には小分子やタンパク質の通り道を提供するポリンや Tom40 などバレル型構造の膜タンパク質 (β バレル型膜タンパク質) が存在し、ミトコンドリアの機能に必須であるが、SAM 複合体はこれらのタンパク質の β バレル構造形成と外膜への組込みを担うトランスロケータである。SAM 複合体の反応サイクルの様々な分子種について、クライオ EM 構造を決定し、反応機構を明らかにすることに成功した。特に、基質の β バレル構造形成の機構が、細菌において 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 BAM 複合体の機構とは大きく異なることを明らかにした。

(3) ミトコンドリア外膜における誤配送タンパク質・異常タンパク質の品質管理機構

研究代表者らは、ミトコンドリア外膜に誤配送された基質はミトコンドリア外膜の AAA タンパク質 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、これまでに見出していた。一方で、トランスロケータの不良などにより外膜透過が停滞して生じる前駆体については、Ubx2 が TOM 複合体と協力して分解系に回すという報告がある。今回、TOM 複合体と Ubx2 の相互作用を解析するための酵母の発現系構築を検討した。

(4) ミトコンドリアを増やす未知の経路

ミトコンドリアは細胞の内外の要因に応じて劇的にその形態と量を変化させる。嫌氣的 (発酵) 条件から好氣的 (呼吸) 条件に代謝状態をシフトさせると、好氣的条件では酸化的リン酸化関連の遺伝子発現が増加するが、シフト時に一過的に発現量が増加する因子の解析はほとんど行われていない。今回、出芽酵母を用いて、ミトコンドリアの体積が劇的に増加するダイオキシシフト時に発現量が増加する因子を網羅的に解析した。同定された因子の中で、単独で過剰発現させると、ミトコンドリア量が抑えられる発酵条件下でもミトコンドリア量が増加するものを見出した。この因子およびそれとの相互作用が確認された因子が協調してはたらくことで、ミトコンドリアが拡大する、これまで知られていなかった経路が存在する可能性が示唆された。

5. 今後の計画

- (1) TOM 複合体の動的平衡の分子基盤: 酵母 TOM 複合体の 2 量体の基質取込み能が発酵条件と呼吸条件で大きく異なることが基質特異性と関係するので、この理由を突き止めることをめざす。
- (2) SAM 複合体の精密構造と作動機構: 酵母 SAM 複合体の様々な反応中間体、様々な基質との複合体、TOM-SAM 超複合体などについてクライオ EM 構造解析を進める。
- (3) ミトコンドリア外膜における誤配送・不良タンパク質の品質管理機構: TOM-Ubx2 複合体の構造機能解析を進める。
- (4) ミトコンドリアを増やす未知の経路: 酵母で同定したミトコンドリア拡大に関わる因子の具体的機能と働く分子機構を明らかにし、この新経路の全貌を解明する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Matsumoto S, Ono S, Shinoda S, Kakuta C, Okada S, Ito T, Numata T, Endo T*
GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER
J. Cell Biol. in press (2022). doi: 10.1083/jcb.202104076
2. Araiso Y, Imai K, Endo T*
Role of the TOM complex in protein import into mitochondria: structural views.
Ann. Rev. Biochem., in press (2022). doi: 10.1146/annurev-biochem-032620-104527
3. 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
4. 2021 **Hans Neurath Award** (The Protein Society 米国蛋白質科学会) 2021 年 7 月
受賞事由 Contribution to the fields of intracellular protein sorting and mitochondrial biology

7. ホームページ等

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>