

生物化学研究室 Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤斗志也 Prof. Toshiya Endo, Ph.D.

1. 研究概要

真核生物の細胞内には高度に発達したオルガネラ（細胞小器官）構造が作られ、それらが細胞に課せられた複雑で膨大な仕事を分散管理している。真核細胞に必須のオルガネラであるミトコンドリアは、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、細胞の内外からの要請とシグナルに応答し、不要となったミトコンドリアを除去する一方で、必要に応じて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 de novo には作られず、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 1000 種類を越えるタンパク質とカルジオリピンをはじめとする特定組成の脂質を、外部から既存ミトコンドリア内に配送、あるいは新規合成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や構造のリモデリングのためのタンパク質と脂質の合成・配送、品質管理、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。さらに最近、ミトコンドリアと ER、液胞等、他のオルガネラとの間に物理的接触（コンタクト）部位が見つかり、それらが脂質輸送に関わる可能性が指摘されている。当研究室では、ミトコンドリアを中心に様々なオルガネラ構造が細胞内でどのようにつくられ、その構造と機能がどのように維持されるのかについて、遺伝学、生化学、細胞生物学、構造生物学など様々な手法を用いて研究している。

2. 本年度の研究成果

ミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体のクライオ電子顕微鏡 (EM) 構造の決定

1000 種におよぶほとんどのミトコンドリアタンパク質はミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体によりミトコンドリア内に取り込まれ、その後外膜、膜間部、内膜、マトリクスといったミトコンドリア内の区画に仕分けられる。外膜には小分子の輸送を担うポリンをはじめとするいくつかの β バレル型膜タンパク質が存在する。 β バレル型膜タンパク質は TOM 複合体を介して外膜を通過した後、膜間部側から外膜のトランスロケータ SAM 複合体により、 β バレル構造をつくりつつ外膜に挿入される。SAM 複合体は Sam35, Sam37, そして β バレル型膜タンパク質の Sam50 と Mdm10 から構成されるが、Mdm10 は常に SAM 複合体に組み込まれているのではなく、SAM 複合体と ERMES 複合体 (ER とミトコンドリアのコンタクトをつくる複合体) との間をダイナミックに往き来することが示唆されていた。私たちは、SAM 複合体が β バレル型膜タンパク質を外膜に組み込む仕組みを解明するために、出芽酵母由来の Mdm10 を含む SAM 複合体と含まない SAM 複合体のクライオ EM 構造を分解能 2.8-3.2Å で決定した (Takeda et al. Nature 2021)。

Mdm10 を含まない SAM 複合体構造では、Sam50 が 2 量体を形成しており ((Sam50)₂-Sam35-Sam37)、各 Sam50 は β バレルが完全に閉じない「ラテラル開口型」であった (この複合体を SAM^{dimer} 複合体と呼ぶ)。Sam50 どうしの相互作用はほとんどなく (界面には脂質がはさままれていた)、Sam35 と Sam37 が互いに相互作用しつつ、Sam50 の 2 量体にサイトゾル側から結合することで、Sam50 を SAM 複合体に固定していた。一方、これまでの生化学的解析と低分解能の EM 解析からは、SAM 複合体の構造として Sam50 : Sam35 : Sam37 = 1 : 1 : 1 の化学量論で構成されるヘテロ 3 量体構造 (SAM^{core} 複合体と呼ぶ) が示唆されており、ミセル中のヘテロ 3 量体のクライオ EM 構造も最近報告された。そこで、His タグおよび HA タグをそれぞれ付加した 2 種類の Sam50 を、内在性 Sam50 を欠失した酵母株に導入し、His タグによるアフィニティ精製を行った。その結果、His-Sam50 とともに HA-Sam50 が精製されたことから、SAM^{dimer} 複合体がミトコンドリア上に確かに存在していることが示された。さらにネイティブ PAGE による複合体サイズの解析や架橋実験により、出芽酵母のミトコンドリア上には SAM^{core} 複合体と SAM^{dimer} 複合体がともに存在することが明らかとなった。それではなぜミトコンドリア上に SAM^{core} 複合体と SAM^{dimer} 複合体が存在するのか。基質の β バレル型膜タンパク質前駆体は、 β バレル構造を形成する β ストランドのうち最も C 端側のストランド中の「 β シグナル」が SAM 複合体に認識されることが知られている。そこで His タグを付加した基質 Tom40 の β シグナルを樹脂に固定

化し、どちらの SAM 複合体が結合するかを調べた。その結果、基質 Tom40 の β シグナルは SAM^{dimer} 複合体に結合することがわかった。すなわち、SAM^{dimer} 複合体は基質の Tom40 を受け入れる前段階の分子種であることがわかった。

現在の私たちのモデルでは、基質 Tom40 の β シグナルが SAM^{dimer} 複合体に認識されると、Tom40 は一方の Sam50 分子と入れ替わる形で SAM 複合体に結合し、一過的に Sam50-Tom40-Sam35-Sam37 という中間体複合体をつくる。この複合体中で、Tom40 の β バレル構造が形成されると考えられる。 β バレル構造が完成すると Tom40 は SAM 複合体から解離する必要があるが、私たちの以前の生化学的解析から、もう一つの β バレル型膜タンパク質の Mdm10 が Tom40 と入れ替わることで、完成型 Tom40 を SAM 複合体から追い出すことが示唆されていた。実際、今回決定された Mdm10 を含む SAM 複合体 (SAM^{Mdm10} 複合体) では、SAM^{dimer} 複合体中の一方の Sam50 分子が Mdm10 に入れ替わっており、Mdm10 のバレル構造内に Sam37 の長いヘリックス構造が入り込むことで、Mdm10 が SAM 複合体につき止められていた。その後、Mdm10 がもう一つの Sam50 分子と入れ替わることで SAM^{dimer} 複合体が再生成され、反応サイクルが完結すると考えられる。

3. Research projects and annual reports

Eukaryotic cells are highly compartmentalized into membrane-bounded organelles with distinct functions. Mitochondria are essential organelles that fulfill central functions in cellular energetics, metabolism and signaling. We are studying the molecular mechanisms of biogenesis and quality control of mitochondria and other organelles from the viewpoint of protein and lipid trafficking.

Most mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and are transported to mitochondria by dedicated import systems. The outer membrane contains several b-barrel membrane proteins, including porins, which are responsible for the transport of small molecules. b-barrel membrane proteins move through the outer membrane via the TOM complex and are inserted into the outer membrane from the intermembrane-space side by the translocator SAM complex, forming a b-barrel structure. The SAM complex is composed of Sam35, Sam37, and the b-barrel membrane proteins Sam50 and Mdm10, yet Mdm10 is not always incorporated into the SAM complex, but it dynamically moves back and forth between the SAM complex and the ERMES complex (an inter-organelle tethering complex between the ER and mitochondria). To elucidate the mechanism by which the SAM complex incorporates b-barrel membrane proteins into the outer membrane, we determined the cryo-EM structures of the yeast SAM complexes with and without Mdm10 at a resolution of 2.8-3.2Å.

In the structure of the SAM complex without Mdm10, Sam50 formed a dimer ((Sam50)₂-Sam35-Sam37), and each Sam50 was "laterally open" with the b-barrel not completely closed (this complex is called the SAM^{dimer} complex). Sam35 and Sam37 interacted with each other and bound to the dimer of Sam50 from the cytosolic side, thereby anchoring Sam50 to the SAM complex. On the other hand, biochemical and low-resolution EM analyses have suggested a heterotrimeric structure (called the SAM^{core} complex) consisting of Sam50 : Sam35 : Sam37 = 1 : 1 : 1 stoichiometry as the structure of the SAM complex, and the cryo-EM structure of the heterotrimer in micelles was also recently reported. We thus introduced two types of Sam50, one with a His-tag and the other with an HA-tag, into a yeast strain lacking endogenous Sam50, and performed affinity purification using the His-tag resin. The results showed that HA-Sam50 was purified together with His-Sam50, indicating that the SAM^{dimer} complex does indeed exist on mitochondria. Furthermore, analysis of the apparent complex size by native PAGE and cross-linking experiments showed that both the SAM^{core} and SAM^{dimer} complexes are present on yeast mitochondria. Then, an arising question is why the SAM^{core} and SAM^{dimer} complexes exist on mitochondria. It is known that the SAM complex recognizes the "b-signal" in the C-terminal b-strand of the b-barrel part of the substrate precursor. Therefore, we immobilized the b-signal of the His-tagged substrate Tom40 on the resin and examined which SAM complex binds to it. We found that the b-signal of substrate Tom40 binds to the SAM^{dimer} complex. In other words, the SAM^{dimer} complex was a species that accommodates the substrate Tom40.

In our current model, when the b-signal of the substrate Tom40 is recognized by the SAM^{dimer} complex, Tom40 binds to the SAM complex in a manner that replaces one of the Sam50 molecules, transiently forming the Sam50-

Tom40-Sam35-Sam37 intermediate complex. Once formation of the b-barrel structure becomes complete, Tom40 needs to dissociate from the SAM complex, but our previous biochemical analyses suggested that Mdm10, another b-barrel membrane protein, could replace Tom40 and drive the mature Tom40 out of the SAM complex. Indeed, in the cryo-EM structure of the SAM complex containing Mdm10 determined in the present study (the SAM^{Mdm10} complex), one of the Sam50 molecules in the SAM^{dimer} complex was replaced by Mdm10, and the long helical structure of Sam37 was inserted into the barrel structure of Mdm10, thereby tethering Mdm10 to the SAM complex. After this, Mdm10 was replaced by another Sam50 molecule, and the SAM^{dimer} complex was re-generated to complete the reaction cycle.

4. 論文, 著書など

原著論文

- H. Takeda, A. Tsutsumi, T. Nishizawa, C. Lindau, J.V. Busto, L.-S. Wenz, L. Ellenrieder, K. Imai, S.P. Straub, W. Mossmann, J. Qiu, Y. Yamamori, K. Tomii, J. Suzuki, T. Murata, S. Ogasawara, O. Nureki, T. Becker, N. Pfanner, N. Wiedemann, M. Kikkawa, and T. Endo, Mitochondrial sorting and assembly machinery operates by b-barrel switching. *Nature* 590 (7844), 163-169 (2021)
- H. Shiino, S. Furuta, R. Kojima, K. Kimura, T. Endo, and Y. Tamura, Phosphatidylserine flux into mitochondria unveiled by organelle-targeted Escherichia coli phosphatidylserine synthase PssA. *FEBS J.* 288, 3285-3299 (2021) (Online published on Dec 7, 2020)
- T. Tamura, A. Fujisawa, M. Tsuchiya, Y. Shen, K. Nagao, S. Kawano, Y. Tamura, and T. Endo, Umeda M, Hamachi I, Organelle membrane-specific chemical labeling and dynamic imaging in living cells. *Nat Chem Biol.* 16 (12), 1361-1367 (2020) (online published on Sep 21, 2020).

英文総説

- Y. Araiso, K. Imai, and T. Endo (Review), Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate. *FEBS J.* online published on Dec 10, 2020
- Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo (Review), Lipid homeostasis in mitochondria. *Biol. Chem.* 401, 821-833 (online published on April 22, 2020)

5. 学会発表など

Toshiya Endo: Pathways, machineries and mechanisms of mitochondrial protein and lipid transport (招待講演) DBB Zoom Seminar (hosted by Stockholm University), Online 2020.6.1

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア・小胞体間におけるリン脂質合成輸送阻害剤の単離 (ポスター発表) 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

柿元百合子, 小島理恵子, 新名真夏, 黒川量雄, 中野明彦, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間結合因子ERMES複合体クラスターの解離がERストレス軽減に寄与する (ポスター発表) 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

松崎淳平, 田代晋也, 新田莉彩子, 尾野雅哉, 吉丸哲郎, 片桐豊雅, 遠藤斗志也, 田村康: Split-APEX2-GFP を用いたヒトミトコンドリア-小胞体間コンタクトサイト局在タンパク質の同定 (ポスター発表), 第72回日本細胞生物学会大会, オンライン, 2020.6.9-11

Haruka Sakaue, Jiyao Song, Toshiya Endo: Requirement of the TOM complex for mitochondrial outer membrane protein biogenesis in vivo (ポスター発表) 第20回日本蛋白質科学会年会, オンライン, 2020.7.7-9

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間におけるリン脂質合成酵素及び輸送因子阻害剤の探索 (口頭発表), 第93回日本生化学会大会, オンライン, 2020.9.14-16

木村啓介, 河合文啓, 平田邦生, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康: Firmicutes bacterium 由来のCDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明 (ポスター発表), 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020.12.2-4

椎野浩也, 橋本美智子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア-小胞体間リン脂質輸送阻害剤の (ポスター発表), 第43回日本分子生物学会年会, オンライン, 2020.12.2-4

木村啓介, 河合文啓, 河合寿子, 小島理恵子, 渡邊康紀, 遠藤斗志也, 田村康: Firmicutes bacterium 由来の CDP-DAG合成酵素Tam41の結晶構造の解明 (口頭発表), 第28回山形分子生物学セミナー, オンライン, 2020.12.3

6. その他特記事項

1) 外部資金

科学研究費補助金・基盤研究 (A)

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解明

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2022 年度 (3 年)→ 中止

科学研究費補助金・基盤研究 (S)

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: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2024 年度 (5 年)

科学研究費補助金・新学術領域研究

課題名: Msp1 によるオルガネラ間コンタクトを介したタンパク質交通の校正

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2021 年度 (3 年)→ 中止

科学研究費補助金・学術変革領域研究 (A)

課題名: 細胞内タンパク質の多重局在とその制御機構の解明

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2024 年度 (5 年)

AMED・CREST

課題名: タンパク質の交通が制御するミトコンドリアプロテオスタシスの構造生物学研究

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: 2020-2024 年度 (5 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名: ミトコンドリアトランスロケータ SAM 複合体の構造・機能研究

研究代表者: 竹田弘法, 取得年度: 2018-2020 年度 (3 年)

科学研究費補助金・若手研究

課題名: X線結晶構造解析によるミトコンドリアトランスロケータ SAM 複合体の構造基盤

研究代表者: 竹田弘法, 取得年度: 2018-2021 年度 (4 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名: ミトコンドリア外膜上で起こる分解経路の生理的意義の解明

研究代表者: 篠田沙緒里, 取得年度: 2019-2021 年度 (3 年)

科学研究費補助金・特別研究員奨励費

課題名: ミトコンドリア膜間部タンパク質の外膜透過における分子機構の解明

研究代表者: 阪上春花, 取得年度: 2020-2022 年度 (3 年)

2) 学外活動

遠藤斗志也: 日本学術会議連携会員

遠藤斗志也: 日本蛋白質科学会役員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会代議員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会常任編集委員

遠藤斗志也: JST/CREST 「細胞内ダイナミクス」細胞内現象の時空間ダイナミクス 研究総括

3) アウトリーチ活動

竹田弘法: 【YouTube ライブ配信 「おうちでラボツアー ミトコンドリアの仕組みを探れ」】

<https://www.miraikan.jst.go.jp/events/202010241602.html>

実施日時： 2020.10.24

場所： 日本科学未来館遠藤プロジェクト研究室よりライブ配信

遠藤斗志也：【YouTube ライブ配信「トークセッション：研究者に聞く、そんなに化学は面白いの？」】

<https://www.miraikan.jst.go.jp/events/202010251603.html>

実施日時： 2020.10.25

篠田沙緒里：【YouTube ライブ配信：第1回 細胞生物若手の会オンライン交流会～すべてはここから始まった】

<https://www.youtube.com/watch?v=TKG7HX6aJFQ&feature=youtu.be>

実施日時： 2020.9.25



R1年9月 研究室(+関連研究者)のリトリート「オルガネラ研究会」(金沢)