

生物化学研究室 Laboratory of Biochemistry

教授 遠藤 斗志也 Prof. Toshiya Endo, Ph. D.

助教 河野 慎 Assist. Prof. Shin Kawano, 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。

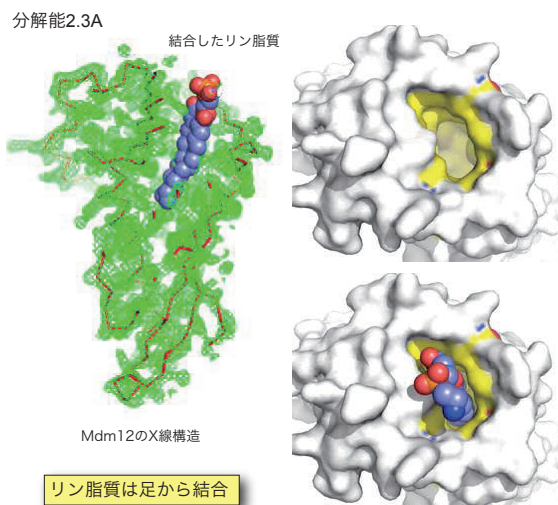
2. 本年度の研究成果

1) ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体の動的アセンブリーの解析

外膜トランスロケータ TOM 複合体の Tom22 を過剰発現して部位特異的光架橋実験をおこなうと、サイトゾルの Hsp70 (Ssa1) との架橋、外膜の Por1 (ヒト VDAC ホモログ) との架橋が見出される。Ssa1 には、TOM 複合体に組み込まれる前の Tom22 を組み込み可能な状態に保つアセンブリー因子の働きがあると考えられる。Por1 にも同様の働きがある可能性があるため、Por1 欠損株で Tom22 の TOM 複合体へのアセンブリーを調べたところ、Tom22 が欠損するとアセンブリー速度が上昇した。野生型酵母株でも、Tom22 はアセンブリー途上で Por1 と一過的に相互作用することが架橋により確認された。したがって、Por1 は複合体に組み込まれないフリーの Tom22 を安定化する働きがあるものと考えられる。さらに、TOM 複合体のサブユニット Tom6 欠損株は 3 量体 TOM 複合体から Tom22 を欠く 2 量体 TOM 複合体に動的平衡をシフトさせるが、Tom6 欠損に加えて Por1 を欠損させると 2 量体 TOM 複合体から 3 量体 TOM 複合体に戻ることが分かった。しかしこの 3 量体 TOM 複合体はインポート能に欠損があり、その理由を検討中である。

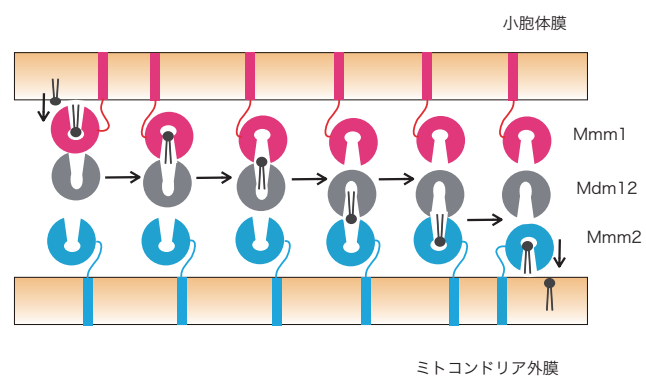
2) ERMES 複合体によるミトコンドリア-ER 間脂質輸送機構の解明

酵母細胞内でミトコンドリアと ER の物理的なコンタクト（テザリング部位）をつくる ERMES が脂質輸送に関わるかどうかを検証すべく、酵母 *K. lactis* の Mdm12 の X 線構造を 2.3 Å の分解能で決定した（右図）。Mdm12 には疎水性の深いポケットが外に向かって開いており、ここにリン脂質が結合していた。このリン脂質は大腸菌細胞膜の主要脂質のホスファチジルエタノールアミン (PE) であった。したがって Mdm12 が脂質結合タンパク質である



こと、脂質の脂肪酸部分を認識して結合すること（頭部を認識しないので脂質の種類に対する特異性は低い）が明らかになった。

以上の構造情報は Mdm12 が脂質結合タンパク質であることを示すが、このことは必ずしも単独で脂質輸送能を示すことを意味しない。Mdm12 は Mmm1 と複合体を形成するので、Mdm12, Mmm1 (MBP との融合タンパク質), Mdm12-Mmm1 複合体の各々について、in vitro でリポソームを用いた脂質輸送アッセイ系を使って、Mdm12 と Mmm1 が脂質輸送に関わる可能性を検討した。大腸菌の発現系から精製した Mdm12, Mmm1 (MBP との融合タンパク質), Mdm12-Mmm1 複合体の、in vitro リポソーム間の脂質輸送能は Mdm12 < Mmm1 << Mdm12-Mmm1 の順番であった。Mdm12 の構造に基づいて Mmm1 の構造をホモロジーモデリングで予想し、それに基づいて Mmm1 の予想脂質結合ポケットの変異体を作成、Mmm1, Mdm12-Mmm1 複合体の in vitro でのリポソーム間の脂質輸送能を調べたところ、変異体ではともに輸送能が低下しており、Mdm12-Mmm1 複合体の脂質輸送能は Mmm1 の脂質結合が重要な役割を担うことがわかった。そこで、新規に開発した酵母細胞から単離した ER・ミトコンドリア膜画分を用いた ER-ミトコンドリア間ホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE) 輸送アッセイ系を用いて、ERMES による脂質輸送能を調べたところ、やはり Mmm1 の変異株では PS の輸送が遅れた。したがって ERMES において、Mdm12-Mmm1 は脂質輸送の最小機能ユニットであり、Mmm1 が重要な役割を果たすことが分かった。ERMES による ER-ミトコンドリア間脂質輸送のメカニズムモデルを右図に示す。



Mmm2もMmm1やMdm12と同様、脂質結合 (SMP) ドメインを持っているので、同じような動きを想定できる。

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 TOM complex in the outer membrane (OM) functions as a protein entry gate through which over 90% of the mitochondrial proteome is imported. The TOM complex consists of the channel-forming β -barrel protein Tom40, and six α -helical membrane proteins. Structural analyses of the TOM complex by site-specific photocrosslinking revealed that the TOM complex exists in two distinct forms, a three-channel form (the “trimer”) and two-channel form (the “dimer”).

Here we discovered that Por1 sequesters the Tom22 molecule that is dissociated from the trimeric TOM complex upon its conversion to the dimeric complex. Por1 is a yeast voltage-dependent anion channel (VDAC) and mediates transport of small molecules across the OM. The absence of Por1 shifts the equilibrium of the TOM complex towards the trimeric form and accelerates the assembly of newly imported

Tom22 into the mature trimeric TOM complex. Tom6 is known to stabilize the trimeric TOM complex; the absence of Tom6 shifts the equilibrium of the TOM complex towards the dimeric form. Intriguingly, simultaneous depletion of Tom6 and Por1 leads to formation of the pseudo-trimeric form of the TOM complex, which was shown to be defective in protein import both in vivo and in vitro. This suggests that Tom6 is critical for guiding the proper assembly of Tom22 into the TOM complex in the absence of Por1, and preventing premature integration of Tom22 into the trimeric TOM complex.

Organelle functions strictly rely on the organelle-specific lipid compositions. How hydrophobic phospholipid molecules can traverse aqueous compartments to shuttle between different membranes is a critical question concerning the mechanism of membrane biogenesis. ERMES (ER-mitochondrial encounter structure) physically links the membranes of the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria in yeast. Although the ER and mitochondria cooperate to synthesize glycerophospholipids, whether ERMES directly facilitates the lipid exchange between the two organelles remains controversial. Here, we compared the X-ray structures of an ERMES subunit Mdm12 from *Kluyveromyces lactis* with that of Mdm12 from *Saccharomyces cerevisiae*, and found that both Mdm12 proteins possess a hydrophobic pocket for phospholipid binding. However in vitro lipid transfer assays showed that Mdm12 alone or an Mmm1 (another ERMES subunit) fusion protein exhibited only a weak lipid transfer activity between liposomes. In contrast, Mdm12 in a complex with Mmm1 mediated efficient lipid transfer between liposomes. Mutations in Mmm1 or Mdm12 impaired the lipid transfer activities of the Mdm12-Mmm1 complex, and furthermore, caused defective phosphatidylserine transport from the ER to mitochondrial membranes via ERMES in vitro. Therefore the Mmm1-Mdm12 complex functions as a minimal unit that mediates lipid transfer between the membranes.

4. 論文, 著書など

- T. Jores, J. Lawatscheck, V. Beke, M. Franz-Wachtel, K. Yunoki, J.C. Fitzgerald, B. Macek, T. Endo, H. Kalbacher, J. Buchner, D. Rapaport, Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. *J Cell Biol.* in press.
- T. Endo, Y. Tamura, and S. Kawano, Phospholipid transfer by ERMES components (Editorial). *Aging*, in press.
- 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.* in press.
- T. Endo, Y. Tamura, Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. *EMBO J.* in press.
- Matsumura, A., Higuchi, J., Watanabe, Y., Kato, M., Aoki, K., Akabane, S., Endo, T. and Oka, T. Inactivation of cardiolipin synthase triggers changes in mitochondrial morphology. *FEBS Lett.* 592, 209-218 (Online published Dec 29, 2017).
- S. Kawano, Y. Tamura, R. Kojima, S. Bala, E. Asai, EA. 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 (online published Dec.26, 2017).
- Y. Tamura and T. Endo, Role of intra- and inter-mitochondrial membrane contact sites in yeast phospholipid biogenesis, *Adv. Exp. Med. Biol.* 995, 121-133 (2017)

遠藤斗志也, ミトコンドリア蛋白質の配送機構, (週刊) 医学のあゆみ 260, 37-41 (2017)

5. 学会発表など

遠藤斗志也: 新たな視点で考えるミトコンドリア生合成の仕組み (招待講演), 大阪大学蛋白質研究所セミナー「真核細胞のオルガネラ研究最前線」吹田市, 大阪, 2017.3.21-22

Toshiya Endo: Biogenesis and maintenance of mitochondria through protein and lipid transport (招待講演) 42nd FEBS Congress, Jerusalem, Israel, 2017.9.10-14

遠藤斗志也: 奇跡の分子, タンパク質が拓く細胞の不思議な世界 (特別講演) 名古屋市立大学総合生命理学部新設記念シンポジウム「未来を拓くサイエンス」名古屋市立大学, 2017.10.15

遠藤斗志也: タンパク質と脂質からミトコンドリアをつくる (招待講演) ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会) シンポジウム「拡大する蛋白質科学のフロンティア」神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

柿本百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFP を用いたオルガネラ膜間テザリング因子の探索, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

沢里克宏, 佐藤諒, 西川華子, 飯村直樹, 藤川鉦樹, 山口敏幸, 車ゆうてつ, 田村康, 遠藤斗志也, 上田卓也, 島本啓子, 西山賢一: タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPlase は生育に必須である, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

荒磯裕平, 包明久, Andr Heuer, Roland Beckmann, 吉川 雅英, 遠藤斗志也: ミトコンドリア膜透過中に翻訳停止したリボソーム・新生鎖複合体の構造・機能研究, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 飯田直也, 遠藤斗志也, 久堀徹, 吉田賢右, 野地博行: 1 分子モーターが動いている瞬間を見る: 時分割動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1 の回転力発生機構の分析, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split GFP を用いたオルガネラ膜間近接評価実験系の確立, 第69回日本細胞生物学会, 仙台国際センター 2017.6.14

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 遠藤斗志也, 久堀徹, 吉田賢, 野地博行: 角度分割・時分割 X 線結晶構造解析による, ほ乳類 F1-ATPase のリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017.6.20-22

渡邊康紀, 田村康, 遠藤斗志也: VAT-1 による ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送の構造基盤, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017.6.20-22

阪上春花, 石坂直也, 塩田拓也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリーにおける Por1 の役割, 第17回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017.6.20-22

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 飯田直也, 遠藤斗志也, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博行: 角度分割・時分割 X 線結晶構造解析による, 哺乳類 F1-ATPase のリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析, 第55回生物物理学会年会, 熊本大学, 2017.9.19-21-22

松本俊介, 中務邦雄, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜へのミスターゲットした膜タンパク質の分解機構の解析, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

小島理恵子, 伊藤喜重, 瀬崎博美, 遠藤斗志也, 田村康: カルジオリピン量の維持には正常なクリステ構造が必要である, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

古田詩唯奈, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: 小胞体膜タンパク質 Ilm1 の欠損はリン脂質輸送とスフィンゴ脂質異常を引き起こす, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

阪上春花, 石坂直也, 塩田拓也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアポリンタンパク質 Por1 は外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリー調節因子として機能する, ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFP を用いたオルガネラ膜間テザリング因子の探索, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

沢里克宏, 佐藤諒, 西川華, 飯村直, 藤川鉦樹, 山口敏幸, 車ゆうてつ, 田村康, 遠藤斗志也, 上田卓也, 島本啓子, 西山賢一: タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPLase は生育に必須である, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

荒磯裕平, 包明久, Andr Heuer, Roland Beckmann, 吉川雅英, 遠藤斗志也: ミトコンドリア膜透過中に翻訳停止したリボソーム・新生鎖複合体の構造・機能研究, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

鈴木俊治, 平田邦生, 山下栄樹, 飯田直也, 遠藤斗志也, 久堀 徹, 吉田 賢右, 野地 博行: 1 分子モーターが動いている瞬間を見る: 時分割動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1 の回転力発生機構の分析, ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会), 神戸ポートアイランド, 2017.12.6-9

6. その他特記事項

外部資金

科学技術振興機構・CREST

課題名: ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワーク

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: H24-29 年度 (6 年)

科学研究費補助金・特別推進研究

課題名: 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

研究代表者: 遠藤斗志也, 取得年度: H27-31 年度 (5 年)

科学研究費補助金・若手研究(B)

課題名: 再構成系により明らかにする膜間リン脂質輸送分子メカニズム

研究代表者: 河野慎, 取得年度: H29-30 年度 (2 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名: ミトコンドリア外膜トランスロケーターによるタンパク質輸送の構造・機能研究

研究代表者: 荒磯裕平, 取得年度: H27-29 年度 (3 年)

科学研究費補助金・特別研究奨励費

課題名: ミトコンドリア内膜トランスロケータ TIM23 と TIM22 複合体の構造生物学的解析

研究代表者: 松本俊介, 取得年度: H27-29 年度 (3 年)

科学研究費補助金・若手研究(B)

課題名: 小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質 VAT-1 の構造機能解析

研究代表者: 渡邊康紀, 取得年度: H28-29 年度 (2 年)

科学研究費補助金・若手研究(B)

課題名: ミトコンドリア外膜の AAA-ATPase Msp1 によるタンパク質品質管理機構

研究代表者: 松本俊介, 取得年度: H28-29 年度 (2 年)

学外活動

遠藤斗志也: 九州大学客員教授

遠藤斗志也: 名古屋大学招聘教員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会評議員

遠藤斗志也: 日本細胞生物学会常任編集委員

受賞等

遠藤斗志也: 平成 29 年度科学研究費助成事業審査委員表彰 (日本学術振興会)



29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」（愛媛）