

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.

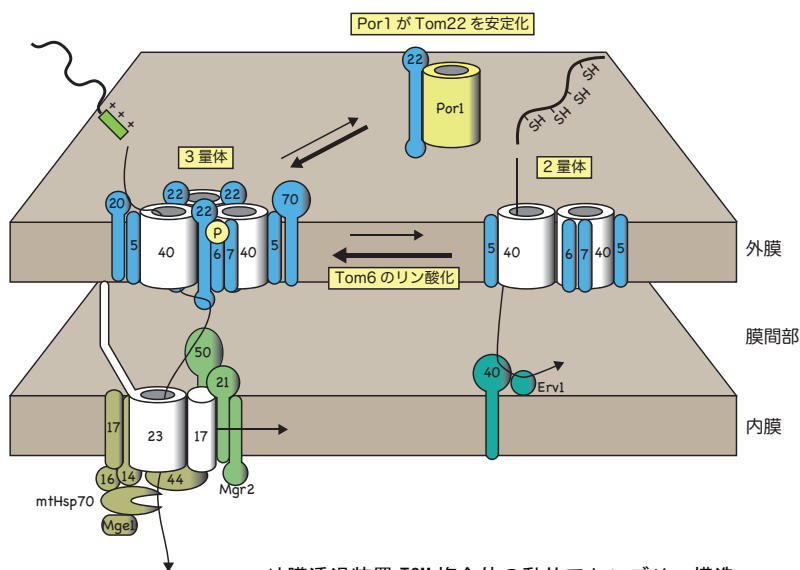
1. 研究概要

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、好气的 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 種類を超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意義の解明

ミトコンドリア外膜トランスロケータの TOM 複合体は 1000 種におよぶミトコンドリアタンパク質のほとんどのミトコンドリア内への移行の搬入口として機能する。一方ミトコンドリア外膜のポリンは小分子の代謝物質やイオンのミトコンドリア内外の出入りを担う。われわれは、TOM 複合体は「孔」として機能する Tom40 3 分子が Tom22 によって糊付けされた 3 量体をつくるが、その一部は Tom22 がはずれて Tom40 が 2 分子の 2 量体に変換することを見出していた。今回、3 量体からはずれた Tom22 にミトコンドリアのポリンが結合すること、すなわちポリンは TOM 複合体 3 量体から一時的にはずれた Tom22 に結合することで、TOM 複合体 3 量体 (Tom22 を含む) から TOM 複合体 2 量体 (Tom22 を含まない) への変換を促進する働きがあることが分かった。それでは TOM 複合体の 3 量体と 2 量体の存在意義は何なのか？今回われわれは、ミトコンドリアタンパク質の多くは 3 量体の TOM 複合体を使ってミトコンドリア内に入るが、膜間部の可溶性タンパク質 (TIM40/MIA 経路により輸送される基質) は 2 量体の TOM 複合体を使ってミトコンドリア内に入ることを新たに見出した。すなわち、ミトコンドリア

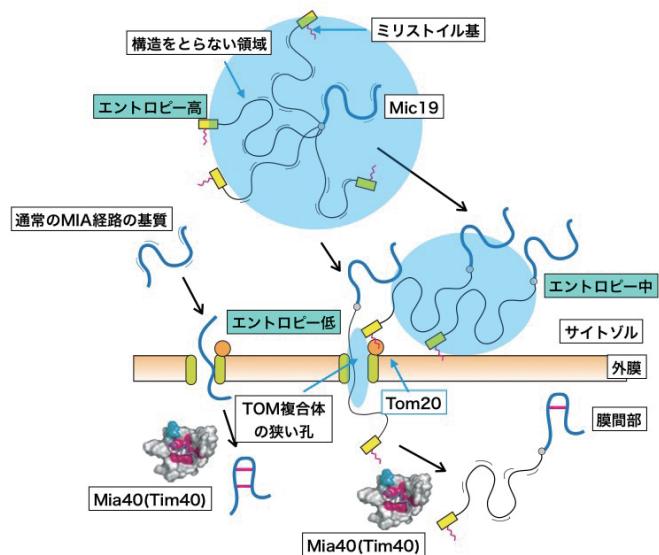


アタンパク質の搬入口 TOM 複合体は、その組成を 3 量体と 2 量体で変えることで、1000 種類に及ぶさまざまなミトコンドリアタンパク質を、効率よく取り込めるようになっていると考えられる。

ポリリンとは逆に、TOM 複合体のサブユニットの 1 つである Tom6 は 2 量体から 3 量体への変換を促進するが、この変換が細胞周期に依存することも明らかになった。すなわち、Tom6 は細胞周期依存的にリン酸化されるが、このリン酸化が 2 量体と 3 量体の安定性を変えていることがわかった。細胞周期に依存して、ミトコンドリアが必要とするタンパク質の種類が異なり、そうしたタンパク質の種類の変化にうまく対応できるよう、2 量体と 3 量体の量比が微調整されているのかもしれない。

2) エントロピーが駆動する新たなミトコンドリアタンパク質輸送機構の発見

正常機能のミトコンドリアを維持するためには、ミトコンドリア内膜のクリステ構造の形成と維持が重要である。クリステ構造の特にジャンクションと呼ばれる部分を作るのに必要な MICOS 複合体の構成因子はサイトゾルで合成され、ミトコンドリア内に移行する。われわれは、酵母の MICOS 複合体を構成する 6 種の因子のうち、Mic19 に、しっかりした立体構造をとらない長い領域があると、MIA 経路による膜間部への輸送が阻害され、その解除には Mic19 のミリスチル化が必要であることを見いだした。また Mic19 がミリスチル化されると、ミトコンドリアの外膜や、外膜の膜透過装置 TOM 複合体の受容体 Tom20 への結合が促進されることもわかった。立体構造をとらない長い領域があると、Mic19 はミトコンドリアの外でのエントロピーが特に高く、そのままでは、TOM 複合体の狭い孔には入りにくくなる（孔に入るとエントロピーが大きく減少する）。しかし、Mic19 をミトコンドリアの外膜や Tom20 に結合させると、ミトコンドリアの外で自由に動き回れる空間が小さくなる、つまりはエントロピーが下がることで、孔に入るときのエントロピー減少が少なくなり、TOM 複合体への輸送がスムーズに行われるようになる。こうしたエントロピーにより駆動される輸送はこれまで想定されていなかったが、N-ミリスチル化は哺乳動物のミトコンドリアタンパク質などで見いだされており、こうしたメカニズムが単に Mic19 のみに見られるのではなく、一般的な輸送の仕組みとして働くことが考えられる。



エントロピーの調節によって駆動されるタンパク質の膜透過

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 and ions across the OM. 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. What is the role of the minor population of the dimeric TOM complex lacking Tom22? We observed that minimizing the proportion of the dimeric TOM complex by Por1 depletion selectively slowed the import of soluble intermembrane-space proteins that use the TIM40/MIA pathway. This suggests that the dimeric TOM complex facilitates import of soluble proteins into the intermembrane space.

The MICOS complex mediates formation of the crista junctions in mitochondria, which is essential for mitochondrial respiration. Here we analyzed the mitochondrial import pathways for the six yeast MICOS subunits as a step toward understanding of the assembly mechanisms of the MICOS complex. Mic10, Mic12, Mic26, Mic27, and Mic60 used the presequence pathway to reach the intermembrane space (IMS). In contrast, Mic19 took the TIM40/MIA pathway, through its CHCH domain, to reach the IMS. Unlike canonical TIM40/MIA substrates, presence of the N-terminal unfolded DUF domain impaired the import efficiency of Mic19, yet N-terminal myristoylation of Mic19 circumvented this effect. The myristoyl group of Mic19 binds to Tom20 of the TOM complex as well as the outer membrane, which may lead to “entropy pushing” of the DUF domain followed by the CHCH domain of Mic19 into the import channel, thereby achieving efficient import.

4. 論文, 著書など (2018.1~2018.12)

H. Sakaue and T. Endo, Regulation of the protein entry gate assembly by mitochondrial porin. *Curr Genet.* in press.

T.K. Sato, S. Kawano, and T. Endo, Role of the membrane potential in mitochondrial protein unfolding and import. *Sci Rep.* in press.

Y. Tamura, R. Kojima, and T. Endo, Advanced *in vitro* assay system to measure phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine transport at ER/mitochondria interface. *Methods Mol Biol.* in press.

H. Sakaue, T. Shiota, N. Ishizaka, S. Kawano, Y. Tamura, K.S. Tan, K. Imai, C. Motono, T. Hirokawa, K. Taki, N. Miyata, O. Kuge, T. Lithgow, and T. Endo, Porin associates with Tom22 to regulate the mitochondrial protein gate assembly. *Mol Cell.* in press.

E. Ueda, Y. Tamura, H. Sakaue, S. Kawano, C. Kakuta, S. Matsumoto, and T. Endo, Myristoyl group-aided protein import into the mitochondrial intermembrane space. *Sci Rep.* in press.

R. Kojima, Y. Kakimoto, S. Furuta, K. Itoh, H. Sesaki, T. Endo, and Y. Tamura, Maintenance of cardiolipin and crista structure requires cooperative functions of mitochondrial dynamics and phospholipid transport. *Cell Rep.* in press.

Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo, Organelle contact zones as sites for lipid transfer. *J.*

Biochem. in press.

- K. Sawasato, R. Sato, H. Nishikawa, N. Imura, Y. Kamemoto, K. Fujikawa, T. Yamaguchi, Y. Kuruma, Y. Tamura, T. Endo, T. Ueda, K. Shimamoto, and K.I. Nishiyama, CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPLase essential for membrane protein integration *in vivo*. **Sci Rep.** in press.
- T. Jores, J. Lawatscheck, V. Beke, M. Franz-Wachtel, K. Yunoki, J.C. Fitzgerald, B. Macek, T. Endo, H. Kalbacher, J. Buchner, D. Rapoport, Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins. **J Cell Biol.** 217, 3091-3109 (2018).
- T. Endo, Y. Tamura, and S. Kawano, Phospholipid transfer by ERMES components (Editorial). **Aging**, 10, 528-529 (2018).
- 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).
- T. Endo, Y. Tamura, Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space. **EMBO J.** 37, 98993 (2018).
- 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, ミトコンドリアと小胞体間のオルガネラコンタクト, 生体の科学 69, 577-580 (2018)
- 河野慎, 遠藤斗志也, (最新のトピックス) 膜間コンタクトサイトで働く脂質輸送タンパク質: SMP ドメインと START(-like)ドメイン, 化学 73, 66-67 (2018)
- 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也, ミトコンドリアと小胞体のクロストーク, 月刊細胞 50, No.8, 412-415 (2018)
- 八木達彦, 遠藤斗志也, 神田大輔, 「化学の要点シリーズ 25: 生化学の論理, 物理化学の視点」 共立出版 (2018)

5. 学会発表など (2018.1~2018.12)

- Toshiya Endo: Mitochondrial Protein and Lipid Transport (招待講演), Gordon Research Conference on Protein Transport across Cell Membranes, Galveston, TX, USA, 2018.3.11-16
- Toshiya Endo: Mitochondrial Protein and Lipid Trafficking (招待講演), Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26
- 遠藤斗志也: Cellular mechanisms to make mitochondria: pathways and machineries (招待講演), 第70回細胞生物学会大会・第51回発生生物学会合同大会シンポジウム「Current Frontiers in Cell and Developmental Biology」東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8
- 河野慎, 遠藤斗志也: ERMES 複合体再構成によるリン脂質輸送 (招待講演) 第18回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ「蛋白質の分子内情報伝達機構の新展開」, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- Toshiya Endo: Mitochondrial protein trafficking across the outer membrane: pathways and machineries (招待講演), International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis: machineries and pathways (基調講演) International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis, 倉敷, 倉敷国際ホテル, 倉敷市民会館, 2018.11.7-10
- Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis and maintenance: pathways and machineries (招待講演), Protein Biogenesis and Mitochondrial Dynamics, Baiersbronn, Germany, 2019.11.19-21
- 松本俊介, 角田千香, 中務邦雄, 田村康, 江崎雅俊, 遠藤斗志也: 2つの AAA-ATPase によるミトコンドリア外膜に誤局在したテイルアンカータンパク質の分解機構 (招待講演) 第41回日本分子生物

- 学会年会 ワークショップ「AAA-ATPase リングが織りなす多彩な細胞機能とそのしくみ」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30
- Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizaka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: Mitochondrial porin modulates the assembly of Tom22 into the TOM complex, Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26
- Shin Kawano, Toshiya Endo: Partial reconstitution analyses indicate the phospholipids transfer functions of the ERMES complex between membranes, Keystone Symposium on Molecular and Cellular Biology: Mitochondrial Biology, The Westin Miyako Hotel, Kyoto, 2018.4.22-26
- Shunsuke Matsumoto, Kunio Nakatsukasa, Yasushi Tamura, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo: Degradation pathway mediated by the two AAA-ATPase Msp1 and Cdc48 for the mistargeted tail-anchored proteins on the mitochondrial outer membrane, 第 70 回細胞生物学会大会・第 51 回発生生物学会合同大会, 東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8
- Yuriko Kakimoto, Shinya Tashiro, Rieko Kojima, Toshiya Endo, Yasushi Tamura: Visualizing multiple inter-organelle contact sites using split-GFP system, 第 70 回細胞生物学会大会・第 51 回発生生物学会合同大会, 東京, タワーホール船堀, 2018.6.5-6.8
- 鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博行: 生体分子モーターはどのようにして力を発生させているのか? 静的・動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1-ATPase の回転力発生機構の分析, 第 46 回生体分子科学討論会, 大阪, 大阪市立大学, 2018.6.22-23
- 木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素 Tam41 の結晶化, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- 荒磯裕平, 包明久, 松本俊介, 柚木芳, 吉川雅英, 遠藤斗志也: ミトコンドリア外膜トランスロケータ TOM 複合体の構造・機能研究, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- 阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 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制御因子として機能する, 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 新潟, 朱鷺メッセ, 2018.6.26-28
- Yuhei Arais, Akihisa Tsutsumi, Shunsuke Matsumoto, Kaori Yunoki, Masahide Kikkawa, Toshiya Endo: Structural and functional study of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- Haruka Sakaue, Takuya Shiota, Naoya Ishizaka, Yasushi Tamura, Toshiya Endo: The regulation of the assembly of the mitochondrial translocator TOM complex by mitochondrial porin, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- Shunsuke Matsumoto, Chika Kakuta, Kunio Nakatsukasa, Yasushi Tamura, Masatoshi Esaki, Toshiya Endo: Two AAA-ATPase-mediated degradation pathways of mislocalized tail-anchored proteins on the outer mitochondrial membrane, International Symposium Proteins: from the cradle to the grave, Hotel Enryakuji Kaikan, Shiga, 2018.8.26-29
- 鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博行: 静的・動的 X 線結晶構造解析による生体分子モーター F1-ATPase の反応過程構造の決定と力発生の分子機構, 第 12 回分子科学討論会, 福岡, 福岡国際会議場, 2018.9.10-13
- 西川周一, 宇治周平, 坂本智昭, 山本雅也, 杉山智之, 木村成介, 遠藤斗志也: シロイヌナズナ小胞体品質管理変異株が高温ストレス下で示す花粉成熟異常の解析, 日本植物学会第 82 回大会, 広島国際会議場, 広島, 2018.9.14-16

鈴木俊治, 山下栄樹, 馬場清喜, 平田邦生, 飯田直也, 遠藤斗志也, 熊坂崇, 久堀徹, 吉田賢右, 野地 博
行: X線結晶構造解析により明らかになった回転分子モーターF1-ATPaseの力発生の仕組み, 第56回日本生物物理学会年会, 岡山, 岡山大学, 2018.9.15-17

丹羽 一, 遠藤斗志也: ミトコンドリア内膜トランスロケータTIM23複合体の構造機能解析, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

田代晋也, 遠藤斗志也, 田村康: 遺伝学的スクリーニングに向けた哺乳類動物細胞内ミトコンドリア-ER膜間コンタクト検出系の構築, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

木村啓介, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: ミトコンドリア型CDP-DAG合成酵素Tam41の結晶化, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

柿元百合子, 田代晋也, 小島理恵子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFPを用いた新規オルガネラ間近接評価実験系の確立, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

阪上春花, 塩田拓也, 石坂直也, 田村康, 遠藤斗志也: ミトコンドリアポリンタンパク質Por1による外膜透過装置TOM複合体のアセンブリー制御, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

工藤真之祐, 古田詩唯奈, 遠藤斗志也, 田村康: リン脂質代謝におけるPah1の機能解析, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

新名真夏, 柿元百合子, 遠藤斗志也, 田村康: Split-GFPを用いたNVJ連携ゾーンの機能の解析, 第91回日本生化学会大会, 京都, 国立京都国際会館, 2018.9.24-26

藤木幸夫, 丹羽一, 宮内(南里)康弘, 奥本寛治, 向井悟, 野井健太郎, 小椋光, 遠藤斗志也: 新しく単離したPex7結合PTS2タンパク質P7BP2は新規ダイニンタイプAAA+である, 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ「AAA-ATPaseリングが織りなす多彩な細胞機能とそのしくみ」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

Takuya Shiota, Haruka Sakaue, Toshiya Endo, Kher Shing Tan, Trevor Lithgow: Cell cycle-dependent dynamic association of the mitochondrial protein entry gate, TOM complex, 第41回日本分子生物学会年会 ワークショップ「Mitochondria-governed evolution and higher-order functions in life」, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也: クライオ電子顕微鏡によるミトコンドリア外膜トランスロケータSAM複合体の構造解析, 第41回日本分子生物学会年会, 横浜, パシフィコ横浜, 2018.11.28-30

6. その他特記事項

外部資金

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: H30-32年度(3年)

学外活動

遠藤斗志也: 日本学術会議連携会員

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

受賞等

阪上春花：第91回日本生化学会大会 若手優秀発表賞（日本生化学会）



30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」（鶴岡）