

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。

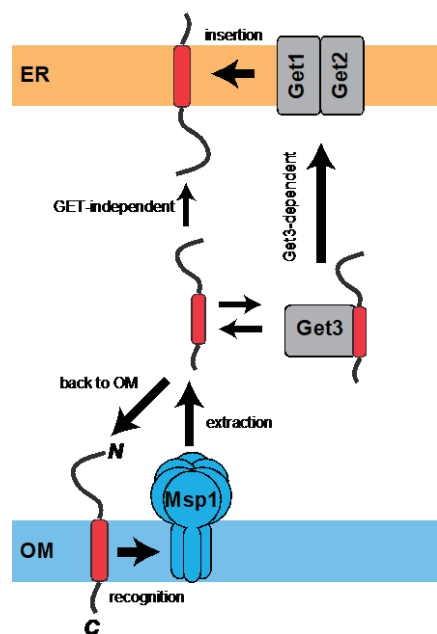
2. 本年度の研究成果

ミトコンドリアに誤配送された膜タンパク質の配送やり直しの分子機構

私たちは、タンパク質の配送にはやり直し（校正）機構が存在すること、すなわちミトコンドリア外膜の AAA-ATP アーゼの Msp1 が、ミトコンドリア外膜に誤配送された膜タンパク質を検出して引き抜き、ER 膜に送り込んで分解するか配送をやり直すかが決まることを見出した。本研究では、Msp1 による配送校正の基質の範囲は何か、他のオルガネラでも校正が起こるのかどうか、オルガネラでの基質タンパク質の移動にオルガネラ間コンタクト部位やシャペロンなどの因子は関与するか、という問いに答えることで、校正の全体像を明らかにすることをめざしている。さらに、他の細胞内局在の校正因子や他に多重局在例の検索、解析への展開も視野にいれている。

これまでに、Msp1 によってミトコンドリア外膜から引き抜かれた誤配送テイルアンカー (TA) タンパク質が ER に移動することを、蛍光顕微鏡によるタイムラプス観察で検証することに成功した。すなわち、ペルオキシソームからミトコンドリアに誤配送されるモデル基質 Pex15 Δ 30 にケイ光タンパク質を融合させた mNG-Pex15 Δ 30 を薬剤 (β -estradiol) 誘導的に一時的に発現させ、その分解を Doa10 欠損により抑制した。次に、Pex15 Δ 30 の発現をオフにし、同時に Msp1 の発現をガラクトース誘導型プロモータ等でオンにしたときの基質の移動を、蛍光顕微鏡でモニターし、いったんミトコンドリアに誤配送された Pex15 Δ 30 がミトコンドリアから ER に移動することを説得力ある形で示すことができた (Matsumoto, Ono et al., JCB accepted, 2022)。

次に Msp1 によって引き抜かれた誤配送 TA タンパク質が、Msp1 以外のどのような因子に依存して ER に移行するかを検討した。新規合成された ER 行きの TA タンパク質はサイトゾルの TA タンパク質専用のシャペロン



Msp1 により引き抜かれた TA タンパク質の ER への配送

Get3 とその ER 上の受容体 Get1/2 (合わせて GET システムと呼ぶ) によって ER への配送が行われる。そこでミトコンドリアに誤配送された Pex15 Δ 30 もこれら GET システムに依存して ER に移行するかどうかを get3 Δ 株, get1 Δ get2 Δ 株を使って調べた。その結果, Msp1 によって引き抜かれた Pex15 Δ 30 のミトコンドリアから ER への移行は GET システムに依存することが明らかになった。しかし Msp1 を過剰発現すると, get3 Δ 株, get1 Δ get2 Δ 株でも Pex15 Δ 30 の一部は ER に移行するので, 効率は低いながら, GET システムに依存しないでミトコンドリアから ER に移行する経路があることがわかる (Matsumoto, Ono et al., JCB online published, 2022)。この経路がミトコンドリア-ER コンタクトを介するのか, は興味深い問題であるが, 今後の検討課題である。

ミトコンドリア外膜トランスロケータ SAM 複合体による β -バレル構造形成の分子機構

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。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。私たちは, SAM 複合体の, 構成サブユニット (タンパク質) が異なる二つの複合体について, 高分解能立体構造を決定することに成功した (Takeda et al., Nature 2021)。そして, SAM 複合体がそのサブユニット (Sam50 と Mdm10) と基質の β バレルタンパク質を入れ替えながら, 基質のバレル構造形成を促し, 外膜に組み込む新規の仕組み (β バレルスイッチモデル) を明らかにした。今回 SAM 複合体と基質 (Tom40) の複合体 (β バレル形成中間体) のクライオ EM 構造を決定した (投稿準備中)。構造から示唆された SAM 複合体による基質タンパク質の β バレル構造形成のメカニズムは, 細菌の BAM 複合体によるメカニズムとは全く異なるものであり, そのようなメカニズムが進化的にどのように獲得されたか, などきわめて興味深い。

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.

We previously found that the cell has a mechanism to achieve proofreading or correction of the delivery of mistargeted tail-anchored (TA) proteins. Msp1, an AAA-ATPase in the mitochondrial outer membrane, detects and extracts TA membrane proteins mistargeted to mitochondria and transfers them to the ER for further delivery to downstream organelles along the secretory pathway or for cytosolic proteasomal degradation. In the current project, we are aiming at obtaining the entire picture of this re-transfer of mistargeted proteins by answering the questions of what the spectrum of the substrates for Msp1-mediated re-transfer is, whether such a re-transfer can operate in other organelles, and whether inter-organelle contact sites and chaperones are involved in the re-transfer of proteins. In addition, we are making efforts for the search and analysis of the factors for other subcellular re-localizations and other cases of multiple protein localizations.

In the present study, we have succeeded in showing the mitochondria-to-ER transfer of mistargeted proteins extracted from the mitochondrial outer membrane by Msp1, using time-lapse fluorescent microscopy. mNG-Pex15 Δ 30, a model mitochondrially mistargeted peroxisomal protein, was transiently expressed by β -estradiol under Doa10-defective conditions to prevent its degradation. Then, expression of mNG-Pex15 Δ 30 was shut off and expression of Msp1 was induced by the galactose-inducible promoter. The fate of mNG-Pex15 Δ 30 was monitored by fluorescent microscopy, thereby convincingly demonstrating that Pex15 Δ 30, once mistargeted to mitochondria, is transferred from mitochondria to the ER (Matsumoto, Ono et al., JCB accepted, 2022).

Next, we examined which factors other than Msp1 are involved in the transfer of mistargeted TA proteins extracted from the mitochondrial outer membrane by Msp1 to the ER. Newly synthesized ER TA proteins are delivered to the ER by Get3, a chaperone dedicated to TA proteins in the cytosol, and its receptor Get1/2 on the ER (together called the GET system). Therefore, we examined if Pex15 Δ 30 mistargeted to mitochondria also depends on the GET system for its transfer to the ER using get3 Δ and get1 Δ get2 Δ strains. The results showed that the transfer of Msp1-extracted Pex15 Δ 30 from mitochondria to the ER was dependent on the GET system. However, when Msp1 was overexpressed, a fraction of mistargeted Pex15 Δ 30 could be transferred to the ER even in get3 Δ and get1 Δ get2 Δ cells, suggesting that there is a pathway for mitochondria-to-ER transfer independent of the GET system, albeit with low efficiency (Matsumoto, Ono et al., JCB accepted, 2022). Whether this pathway requires the mitochondria-ER contact is an interesting question, and will be a subject of future studies.

Molecular mechanism of β -barrel protein folding by a mitochondrial outer membrane translocator, the SAM complex.

The mitochondrial outer membrane contains β -barrel membrane proteins such as porins and Tom40, which mediate the exchange of small molecules, ions, and proteins between the cytosol and mitochondria and are essential for mitochondrial functions. The SAM complex in the mitochondrial outer membrane is a translocator responsible for the formation of the β -barrel structure of these proteins and their incorporation into the outer membrane. We have previously determined the high-resolution structures of the two forms of the SAM complex, each of which contains different subunit proteins (Takeda et al., Nature 2021). We revealed a novel mechanism (β -barrel switch model) in which the SAM complex switches its subunits (Sam50 and Mdm10) with the β -barrel protein substrate to promote its formation of the β -barrel structure and its insertion into the outer membrane. In this study, we have determined the cryo-EM structure of the complex (β -barrel forming intermediate) of the SAM complex and a substrate Tom40 (in preparation). The mechanism of the SAM-mediated β -barrel folding is completely different from the one mediated by the bacterial BAM complex, and therefore, it is extremely interesting to know how this mechanism was acquired evolutionarily.

4. 論文, 著書など

原著論文

- 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. May 288, 3285-3299 (2021).
- K. Kimura, F. Kawai, H. Kubota-Kawai, Y. Watanabe, K. Tomii, R. Kojima, K. Hirata, Y. Yamamori, T. Endo, Y. Tamura. Crystal structure of Tam41 cytidine diphosphate diacylglycerol synthase from a Firmicutes bacterium. J. Biochem.171, 429-441 (2022).
- S. Matsumoto, S. Ono, S. Shinoda, C. Kakuta, S. Okada, T. Ito, T. Numata, T. Endo. GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. J. Cell Biol. 221, e202104076 (accepted on March 14, 2022).

英文総説

- Y. Araiso, K. Imai, and T. Endo (Review), Structural snapshot of the mitochondrial protein import gate. FEBS J. Sep;288, 5300-5310 (2021).
- Y. Araiso, K. Imai, T. Endo (Review), Role of the TOM complex in protein import into mitochondria: structural views. Ann. Rev. Biochem., in press (2022, online published Feb 14, 2022).

日本語解説記事/著書

松本俊介, 遠藤斗志也 ミトコンドリア AAA-ATP アーゼ Msp1 による誤配送タンパク質の配送校正機構 (みにれびゅう) 生化学 93, 512-516 (2021)

竹田弘法, 荒磯裕平, 遠藤斗志也. ミトコンドリアへのタンパク質搬入口と膜組み込み装置の構造生物学~TOM 複合体と SAM 複合体のクライオ電子顕微鏡構造 in 「ミトコンドリアダイナミクス~機能研究から疾患・老化まで」 (NTS, 全 458 頁) 第 1 編, 第 7 章, 第 1 節 pp197-202 (2021)

竹田弘法, 遠藤斗志也. SAM 複合体によるミトコンドリア β バレル膜タンパク質の膜組み込み (トピックス) 生物物理 61, 392-394 (2021)

5. 学会発表など

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリア外膜蛋白質挿入装置のクライオEM構造, 日本顕微鏡学会 第77回学術講演会シンポジウム「クライオ電子顕微鏡による最新の成果」, つくば市+ハイブリッド, 2021.6.14-16, 国内, 口頭

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリアタンパク質膜挿入の構造基盤, 第21回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「高速分子動画: タンパク質の構造機能相関研究の最先端」, つくば市+ハイブリッド, 2021.6.16-18, 国内, 口頭

Toshiya Endo, (Plenary lecture) Protein machineries that make and maintain mitochondria 35th Annual Symposium of the Protein Society, オンライン, 2021.7.7-14, 国外, 口頭

遠藤斗志也, タンパク質の細胞内配送原理の再構築, 第94回日本生化学会大会 シンポジウム「マルチファセット・プロテインズ: 拡大し変容するタンパク質の世界」, オンライン, 2021.11.3-5, 国内, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, ミトコンドリアAAA-ATPアーゼMsp1による誤配送タンパク質の配送校正機構, 第94回日本生化学会大会シンポジウム「多面的ミトコンドリア機能による生命機能制御」, オンライン, 2021.11.3-5, 国内, 口頭

松本俊介, 小野鈴花, 遠藤斗志也, Proofreading of protein mislocalization mediated by a mitochondrial AAA-ATPase Msp1, 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「オルガネラ膜タンパク質の標的化と品質管理」横浜+ハイブリッド, 2021.12.1-3, 国内, 口頭

Yuhei Arais, Akihisa Tsutsumi, Kenichiro Imai, Takuya Shiota, Hirotsu Imai, Kana Kuzasa, Noriyuki Kodera, Masahide Kikkawa, Toshiya Endo, Structural analysis of the mitochondrial protein import gate by near-atomic resolution snapshot and nanoscale video imaging, 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「多様なミトコンドリアの戦略: 強く健康なオルガネラ構築に向けて: Multifaceted strategies for keeping mitochondria strong and healthy」横浜+ハイブリッド 2021.12.1-3 国内, 口頭

竹田弘法, 包明久, 吉川雅英, 遠藤斗志也, ミトコンドリアにおける β バレルタンパク質膜挿入の構造基盤 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「生命科学の根幹に迫るミトコンドリアダイナミクスの世界」, 横浜+ハイブリッド, 2021.12.1-3, 国内, 口頭

遠藤斗志也, (特別講演), タンパク質の交通が解き明かすミトコンドリア生合成の仕組み 第20回 日本ミトコンドリア学会年会, 東京+ハイブリッド, 2021.12.9-10, 国内, 口頭

遠藤斗志也, (特別講演), タンパク質と脂質の輸送から見えてきたミトコンドリア生合成と機能維持の仕組み AMED難治性疾患実用化研究事業「多様なミトコンドリア病の遺伝子型/表現型/自然歴等をガイドラインに反映させていくエビデンス創出研究」班(村山班・小坂分担班)集中TR会議, オンライン, 2022.2.19, 国内, 口頭

九笹 加菜, 今井 大達, 古寺 哲幸, 稲津 明広, 遠藤 斗志也, 荒磯 裕平, 高速原子間力顕微鏡を用いたミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の動的構造解析, 日本生化学会北陸支部 第39回大会, オンライン, 2021.6.5, 国内, 口頭

荒磯 裕平、包 明久、今井 賢一郎、塩田 拓也、吉川 雅英、遠藤 斗志也、クライオ電子顕微鏡解析によって明らかになったミトコンドリアタンパク質搬入ゲートTOM複合体の構造と機能、日本生化学会北陸支部 第39回大会、オンライン、2021.6.5、国内、口頭

小西雄大、遠藤 斗志也、阪上春花、竹田弘法、齊藤知加、酵母アルデヒドデヒドロゲナーゼ Hfd1の細胞内二重局在の分子機構、第73回日本細胞生物学会大会、オンライン、2021.6.29-7.2、国内、口頭

阪上春花、遠藤 斗志也、小分子輸送体ポリリンによるタンパク質膜透過装置TOM複合体の機能制御の分子機構、第94回 日本生化学会大会、オンライン、2021.11.3-5、国内、口頭+ポスター

Kana Kuzasa, Hirotsu Imai, Noriyuki Kodera, Akihiro Inazu, Toshiya Endo, Yuhei Araiso, High-Speed atomic force microscopy analysis of the mitochondrial protein import gate TOM complex, 第44回日本分子生物学会年会、横浜+ハイブリッド、2021.12.1-3、国内、ポスター

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 (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・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

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

篠田沙緒里：【昭和女子大学 大学生向けラボツアー】

実施日時：2021 年 7 月 5 日 , 2022 年 11 月 10 日

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：昭和女子大学大学生 3 名(7 月), 2 名(11 月)に対し, 研究内容の紹介, 研究室ツアーを行った。研究プロジェクトの紹介をしつつ, 研究室内のさまざまな装置について詳細に説明行った。

篠田沙緒里：【未来館来館者向けラボツアー】

実施日時：2021 年 8 月 25 日 12:00-16:00

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：3 階ハブスペース解放に際し, 興味を持った来館者に別途遠藤研の外からの見学と, 普段話すことのない研究者との対談を行った。

篠田沙緒里：【仙台二校 高校生向けラボツアー】

実施日時：2021 年 12 月 24 日 11:20~12:00

場所：遠藤プロジェクト研究室

内容：仙台二校の高校生 5 名に対し, 研究内容の紹介, 研究室ツアー, 事前に受け付けた質問の回答を合わせた対談を行った。研究室ツアーではミトコンドリアを染色した生きた状態のヒト培養細胞を蛍光顕微鏡を使って実際に観察してもらった。

4) 受賞等

2021 年 7 月 2021 Hans Neurath Award (The Protein Society)

受賞事由 Contribution to the fields of intracellular protein sorting and mitochondrial biology



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)