

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) ノンストップ膜タンパク質の品質管理

真核生物の細胞内で合成されるタンパク質の 2/3 は分泌経路またはオルガネラに向かう。終止コドンの欠失により新生鎖として翻訳が停止したノンストップ (NS) タンパク質の品質管理については、これまでは専らサイトゾルの NS タンパク質が対象であった。われわれは最近、オルガネラ行きの NS タンパク質の品質管理について解析を行い、NS オルガネラタンパク質はリボソームだけでなく、オルガネラ上の膜透過チャネルを占有するため、細胞にとって有害であること、細胞にはこれを回避するために、Dom34: Hbs1 により NS タンパク質をオルガネラ内にリリースする仕組みをもっていることを見出した。そこでオルガネラ行き NS タンパク質の品質管理の研究を NS オルガネラ膜タンパク質の品質管理の研究へと発展させ、ER 膜上の様々な膜トポロジーの一回膜貫通型膜タンパク質について、NS 化により膜透過チャネルの占有状態がどう変わるのか、サイトゾルにおける NS タンパク質分解の仕組みが関与するかについて検討を行った。

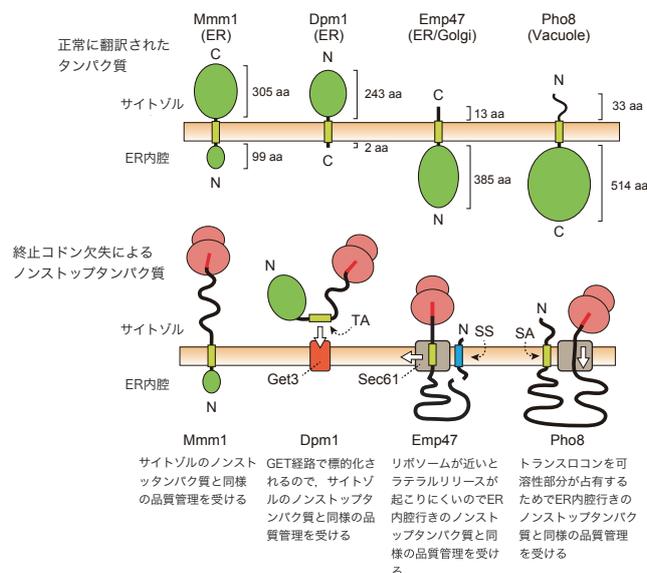


図1 ノンストップ膜タンパク質の品質管理

質の品質管理の研究へと発展させ、ER 膜上の様々な膜トポロジーの一回膜貫通型膜タンパク質について、NS 化により膜透過チャネルの占有状態がどう変わるのか、サイトゾルにおける NS タンパク質分解の仕組みが関与するかについて検討を行った。

C 末端側に膜貫通 (TM) 配列を持つ C アンカー型膜タンパク質は GET システムにより ER 膜に標的化されるため、Sec61 トランスロコン（膜透過チャネル）を占有することなく、サイトゾルで Ltn1 によるユビキチン化→プロテアソームによる分解という品質管理を受ける。N 端付近に TM 配列をもつ N アンカー型膜タンパク質は、Sec61 トランスロコンから TM 配列がラテラルに ER 膜にリリースされるため、やはり Sec61 トランスロコンを占有することなく、サイトゾルで Ltn1 によるユビキチン化とプロテアソーム分解による品質管理を受ける。N 端にシグナル配列、C 端 TM 配列を

もつ膜タンパク質は Sec61 トランスロコンからのラテラルリリースが十分でないため、一部トランスロコンのチャンネルを占有する。N 端側にシグナルアンカー (SA) 配列を持つ膜タンパク質は SA 配列に続く大きなドメインが ER 内腔側に膜透過し、C 端側はリボソームがサイトゾル側に残るため、Sec61 トランスロコンを占有する。これらの二つのケースでは、Dom34 による NS タンパク質の内腔側へのリリースが必須の品質管理機構となることが分かった。

2) ミトコンドリア外膜-内膜間での脂質輸送の構造生物学的解析

ミトコンドリア機能に必須の脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) の原材料のリン脂質ホスファチジルセリン (PS) は ER で作られ、ER からミトコンドリアの外膜へ、さらに外膜から内膜へと運ばれ、内膜上の Psd1 により PE に変換される。27 年度にホスファチジン酸のミトコンドリア外膜から内膜への輸送に関わる Ups1-Mdm35 の X 線構造を決定し、輸送の分子機構を解明した。今回は PS の輸送に関与する因子の候補として Ups1 のホモログ Ups2 と Mdm35 を考え、ミトコンドリア内膜における Psd1 依存型 PE 合成以外の PE 合成経路を欠失した酵母変異体を用いて、Ups2 欠損の影響を解析した。Ups2 が欠失すると PE が減少すること、この減少は酵母の増殖過程が発酵からミトコンドリアの好気呼吸にスイッチする (ダイオキシシフト) ことで顕著になること、が明らかになった。さらに *in vitro* で精製 Ups2-Mdm35 を用いたリボソーム間脂質輸送アッセイを行い、Ups2-Mdm35 が PS を効率よく輸送することを示した。以上の結果から、Ups2-Mdm35 はミトコンドリアの外膜-内膜間で PS を輸送するタンパク質であることが明らかになった。

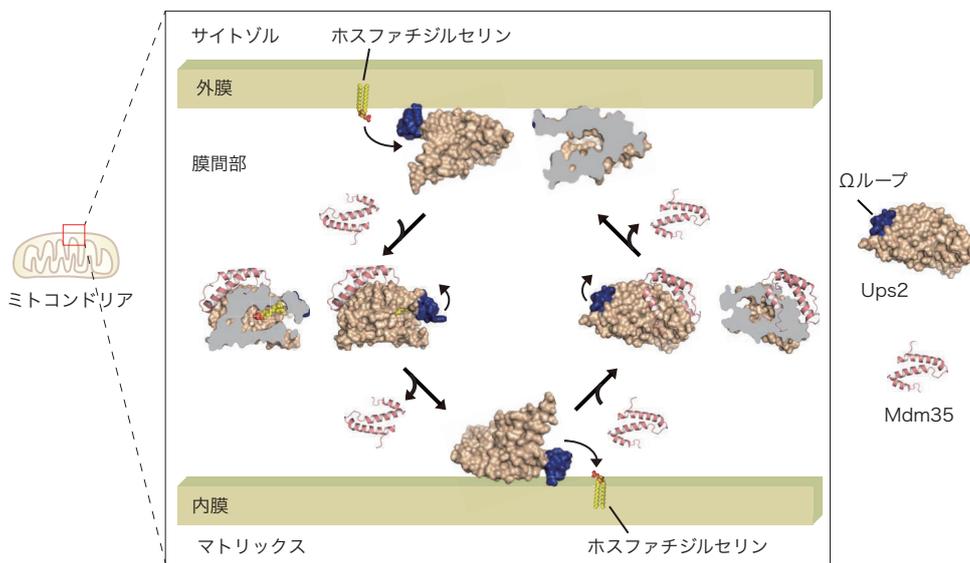


図2 ミトコンドリア内膜外膜間でホスファチジルセリンを輸送する Ups2-Mdm35

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.

Proteins are under the elaborate surveillance to maintain cellular protein homeostasis. mRNA lacking an in-frame stop codon called “nonstop mRNA” would generate aberrant “nonstop (NS) proteins” as well as accumulation of stalled ribosome-nascent chain (RNC) complexes. Although degradation of nonstop cytosolic proteins has been extensively studied, fate of NS proteins targeted to organelles such as the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria was characterized only in a few studies. Among them, we found that, when degradation of NS mRNAs does not work efficiently, NS proteins targeted to the ER or mitochondria occupy not only translating ribosomes but also translocons (translocators) in the organellar

membranes. The Dom34-Hbs1 complex therefore acts on the stalled ribosomes to release stuck nonstop proteins into the organelle lumen, otherwise the protein flux into the organelle is blocked, resulting in defective cell growth.

Here we asked which of the pathways, the cytosolic Ltn1 and proteasome-dependent degradation and the Dom34-Hbs1 dependent release into the ER lumen, NS-ER membrane proteins can be targeted to. We thus followed the fate of NS-membrane proteins at the ER membrane with different membrane topologies, and found that Ltn1-dependent degradation differed for membrane proteins with different topologies and its failure did not affect ER protein import or cell growth. On the other hand, failure in the Dom34-dependent release of the nascent polypeptide from the ribosome led to the block of the Sec61 channel and resultant inhibition of other protein import into the ER caused cell growth defects. Therefore, the nascent membrane protein release from the translation apparatus is more instrumental in clearance of the clogged ER translocon channel and thus maintenance of normal cellular functions.

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. We previously determined the X-ray structure of Ups1-Mdm35 and revealed the molecular mechanism of Ups1-Mdm35 mediated phosphatidic acid (PA) transfer between the mitochondrial outer membrane (OM) and inner membrane (IM). Here we asked if Ups2, an Ups1 homolog, can transfer phosphatidylserine (PS) between the OM and IM in cooperation with Mdm35 for phosphatidylethanolamine (PE) synthesis at the IM by Psd1. In the genetic background, where only the mitochondrial PE synthetic pathway is in operation, deletion of the UPS2 gene significantly reduced the level of PE, especially upon diauxic shift. In addition, by using recombinant Ups2 and Mdm35, we could show that Ups2-Mdm35 efficiently transfers PS between liposomes in vitro in a similar manner that Ups1-Mdm35 transfer PA between liposomes. Therefore we concluded that Ups2 transfer PS between the OM and IM for PE synthesis at the IM.

4. 論文、著書など

- T. Suzuki, N. Iida, J. Suzuki, Y. Watanabe, T. Endo, T. Hisabori, M. Yoshida: Expression of mammalian mitochondrial F₁-ATPase in Escherichia coli depends on two chaperone factors, AF1 and AF2. FEBS Open Bio. 6, 1267-1272 (2016).
- R. Kojima, S. Kajiura, H. Sesaki, T. Endo, and Y. Tamura: Identification of multi-copy suppressors for endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett. 590, 3061-3070 (2016).
- Arakawa, K. Yunoki, T. Izawa, Y. Tamura, S. Nishikawa, and T. Endo: Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol. Sci. Rep. 6, Article number: 30795 (2016).
- R. Kojima, T. Endo, and Y. Tamura : A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro. Sci. Rep. 6, Article number 20777 (2016).
- T. Jores, A. Klinger, L. E. GroB, S. Kawano, N. Flinner, E. Duchardt-Ferner, J. Wo "hnert, H. Kalbacher, T. Endo, E. Schleiff, and D. Rapaport: Characterization of the targeting signal in mitochondrial β -barrel proteins . Nature Commun. 7, Article number 12036 (2016).
- N. Miyata, Y. Watanabe, Y. Tamura, T. Endo, and O. Kuge: Phosphatidylserine transport by Ups2-Mdm35 in respiration-active mitochondria . J. Cell Biol. 214, 77-88 (2016) (featured by Bruno Mesmin, "Mitochondrial lipid transport and biosynthesis: A complex balance" Spotlight, J. Cell Biol. 214, 9-11 (2016)).

5. 学会発表など

- Toshiya Endo: Transport of Proteins and Lipids to Mitochondria Gordon Research Conference: Mitochondria and Chloroplasts (招待講演) , Mount Snow, West Dover, VT, USA, 2016.6.19-24
- Toshiya Endo: Machineries for mitochondrial protein and lipid transport (招待講演) FASEB Science Research Conference: Molecular Biophysics of Membranes, Snowmass, Colorado, USA, 2016.7.10-15

Toshiya Endo: Quality control of nonstop proteins at the organelle membranes. Nascent Chain Biology Meeting (招待講演)、富士レークホテル (山梨県富士河口湖町)、2016. 9.1-3

Toshiya Endo: Mitochondrial biogenesis through protein and lipid transport (基調招待講演)、ICES 2016 Kyoto (The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis)、京都府立大学 (京都府京都市)、2016. 9. 10-14

塩田 拓也、今井 賢一郎、深沢 嘉紀、富井 健太郎、Paul Horton、遠藤 斗志也: ミトコンドリアタンパク質搬入口、TOM 複合体の分子形態、および機能、第16回日本蛋白質科学会年会 若手奨励賞シンポジウム、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)、2016. 6. 7-9

遠藤 斗志也: タンパク質と脂質を運んでミトコンドリアをつくる仕組み (招待講演)、第54回生物物理学会年会シンポジウム「ミトコンドリアの分子マシナリーと機能管理、合成、構造、機能、適応、そして淘汰」、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)、2016. 11. 25-27

田村 康、小島 理恵子、遠藤 斗志也: リン脂質輸送におけるERMES複合体の役割 (招待講演)、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム「ミトコンドリアとオルガネラのコミュニケーション」、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016. 11. 30-12. 2

塩田拓也、今井賢一郎、Paul Horton、遠藤 斗志也、Trevor Lithgow: ミトコンドリアタンパク質搬入口の形と機能 (招待講演)、第39回分子生物学会年会シンポジウム「多才なミトコンドリアを支える分子基盤」、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016. 11. 30-12. 2

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」、大阪大学蛋白質研究所 (大阪府吹田市)、2017. 3. 21-22

Jiyao Song, Yasushi Tamura, Tohru Yoshihisa and Toshiya Endo: Analysis of the outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial proteins, Keystone Symposium on Molecular and Cell Biology: Mitochondrial Dynamics 2016, Sheratone Steamboat Resort, Steamboat Springs, Colorado, USA, 2016. 4. 3-7

松本俊介、田村康、江崎雅俊、遠藤 斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットしたタンパク質の分解機構の解析、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場 (福岡県博多市)、2016. 6. 7-9

荒磯裕平、柚木芳、河野慎、鈴木純子、包明久、吉川雅英、遠藤 斗志也: 立体構造解析に向けたミトコンドリア外膜トランスロケーター TOM40 複合体の大量調製、第16回日本蛋白質科学会年会、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)、2016. 6. 7-9

柚木芳、荒川俊輔、井澤俊明、西川周一、田村康、遠藤 斗志也: ミトコンドリアにおけるノンストップタンパク質の品質管理機構の解析、第68回細胞生物学会大会、京都テルサ (京都府京都市)、2016. 6. 15-17

松本 俊介、田村 康、江崎 雅俊、遠藤 斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットしたタンパク質の 分解機構の解析、第68回細胞生物学会大会、京都テルサ (京都府京都市)、2016. 6. 15-17

Yasunori Watanabe, Yasushi Tamura, Shin Kawano, Toshiya Endo: Structural basis of phospholipid transfer between the mitochondrial outer and inner membranes by Ups1-Mdm35, FASEB Science Research Conference: Molecular Biophysics of Membranes, Snowmass, Colorado, USA, 2016.7.10-15

Kaori Yunoki, Shunsuke Arakawa, Toshiaki Izawa, Shuh-ichi Nishikawa, Yasushi Tamura, and Toshiya Endo: The analysis of quality control systems for nonstop proteins in the ER and mitochondria, Nascent Chain Biology Meeting, 富士レークホテル (山梨県富士河口湖町) , 2016. 9.1-3

Yuhei Arais, Kaori Yunoki, Shin Kawano, Junko Suzuki, Akihisa Tsutsumi, Masahide Kikkawa, and Toshiya Endo: Large-scale purification of the protein translocator of the outer mitochondrial membrane, Nascent Chain Biology Meeting、富士レークホテル (山梨県富士河口湖町)、2016. 9.1-3

古田詩唯奈、小島理恵子、田村康、遠藤 斗志也: 小胞体膜タンパク質 Ilm1 はミトコンドリア小胞体間リン脂質輸送を負に制御する、第89回日本生化学会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)、2016.9.25-27

小島理恵子、遠藤 斗志也、田村康: 新規のin vitro PS輸送実験を用いたERMES複合体のリン脂質輸送機能の解明、第89回日本生化学会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)、2016.9.25-27

植田依里、田村康、遠藤 斗志也: ミトコンドリアクリステジャンクション形成に与するMic19の輸送機構の解析、第89回日本生化学会、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス (宮城県仙台市)、2016.9.25-27

渡邊康紀、田村康、遠藤 斗志也: 小胞体-ミトコンドリア間のリン脂質輸送タンパク質CAT-1の構造機能解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016. 11. 30-12. 2

松本俊介、江崎雅俊、田村康、遠藤 斗志也: ミトコンドリア外膜へミスターゲットした膜タンパク質の分解機構の解析 第39回日本分

子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）、2016.11.30-12.2

Jiyao Song, Tohru Yoshihisa, Yasushi Tamura and Toshiya Endo: Analysis of the outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial proteins, American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016, San Francisco, USA, 2016.12.3-7

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・特別研究奨励費 課題名：ミトコンドリア膜間のリン脂質輸送機構の構造生物学的解明 研究代表者：渡邊康紀、取得年度：H26-28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・基盤研究(C) 課題名：GPCR のアロステリックリガンド：細胞応答測定による親和性解析法とリガンド探索 研究代表者：須賀比奈子、取得年度：H26-28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 28 年度文部科学大臣表彰科学技術賞（研究部門）



H28年9月 研究室（+CREST チーム）のリトリート（山形）