

## ミトコンドリア膜を舞台としたタンパク質の交通管制機構の 解明

Elucidation of the mechanism of the control of protein  
trafficking at mitochondrial membranes

遠藤 斗志也 (ENDO TOSHIYA)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授



### 研究の概要

近年明らかになりつつあるミトコンドリアの膜構造の新しい描像に基づき、ミトコンドリアタンパク質がミトコンドリア内の目的区画に正しく移行する交通管制システムの作動原理を明らかにするとともに、それを担うトランスロケータや関連する因子の構造を解明し、小胞体膜、ミトコンドリア外膜と内膜の間で効率よく脂質やタンパク質が移動する仕組みを解明する。

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞小器官、タンパク質、脂質

### 1. 研究開始当初の背景

酵母ミトコンドリアには、1000種類を超えるタンパク質を適切に配送する交通管制システムが存在する。最近、ミトコンドリアの膜構造、レドックス、脂質とミトコンドリアタンパク質の交通に関する新発見等が相次ぎ、ミトコンドリアタンパク質の交通をめぐる概念が大きく書き換えられつつある。

### 2. 研究の目的

これまでの研究を発展させ、ミトコンドリアの膜構造や脂質、レドックス状態、小胞体など他のオルガネラとの関係を含む大きなフレームで、ミトコンドリアタンパク質の交通管制の問題に取り組む。膜を舞台とした、壮大なミトコンドリアタンパク質の交通管制システムの全体像を脂質の合成や交通も取り込んで解明することにより、細胞機能と細胞内構造の関係に関わる新たなパラダイム発見への道を開きたい。

### 3. 研究の方法

(1) ミトコンドリア-小胞体接合複合体 (ERMES) の関連因子の検索と構造決定を目指す。(2) ミトコンドリア外膜-内膜融合部位 (コンタクトサイト) について、構成因子の検索と同定を目指す。(3) トランスロケータと呼吸鎖複合体の相互作用の実態と意義を解明する。(4) Tom22のアセンブリー過程で *in vivo* 架橋される因子を足がかりに、新経路と関与する因子の検索を行う。(5) 脂質と交通というホットな問題に関して、メンテ

ナンス因子 Tam41 を足がかりとして、小胞体-ミトコンドリアにまたがる脂質合成-配送システムの解明に挑む。(6) ミトコンドリア膜間部のレドックス制御システムの構成因子の構造決定と機能解明を目指す。(7) 膜貫通因子を含む、トランスロケータというマシナリーの構造決定にチャレンジする。

### 4. これまでの成果

(1) ERMES 構成因子の構造決定 小胞体膜とミトコンドリア外膜を物理的に接合する ERMES は、Mmm1、Mmm2、Mdm10、Mdm12 から成る。酵母 *K. lactis* の ERMES 構成因子、Mdm12 と Mmm1 を大腸菌に共発現させて精製し、Mdm12 の X 線構造を 2.3Å の分解能で決定する事に成功した。Mdm12 には疎水性の大きな空間が外に向かって開いており、ここに未同定のリン脂質と思われる電子密度が見られた。Mdm12 が小胞体膜からミトコンドリア外膜へとリン脂質を輸送するキャリアとして働く可能性が強く示唆された。

(2) ERMES と TOB 複合体間を移動する Mdm10 の機能 TOB 複合体には ERMES 構成サブユニットの Mdm10 が常時出入りしており、TOM40 複合体のサブユニット Tom7 が、この出入りの平衡を決めていること、そのことで生合成された Tom40 が他のサブユニットとアセンブリーするために TOB 複合体から出ていくタイミングを決めることを見いだした。アセンブリー時に複雑な膜タンパク質複合体の品質を保証する新たな仕組

みと考えられる。

(3) 外膜トランスロケータの作動時のサブユニット間相互作用のスナップショット  
部位特異的光架橋法により、TOM40 複合体中の Tom22 と近傍タンパク質との相互作用をマッピングした。さらに基質である前駆体を TOM40 複合体に蓄積させ、Tom22、Tom20、Tim50 の相互作用マッピングのパターンがどのように変化するかを解析した。この結果に基づき、Tom22 と Tom20 が協力してプレ配列を認識する仕組み、Tom22 から内膜トランスロケータ Tim50 に前駆体プレ配列が引き渡される仕組みを明らかにした。

(4) Tom22 のアセンブリーに関わる因子の同定 *in vivo* 部位特異的光架橋法により、Tom22 を酵母細胞内で過剰発現すると、TOM40 複合体に組み込まれる前に一過的に架橋産物を生ずることを見出した。架橋相手のうちサイトゾルの因子は Hsp70 分子シャペロンであり、2 種類の外膜の因子のうち一つは外膜のポリン (Por1) であった。Por1 は TOB 複合体を介した Tom22 のアセンブリーに関わることを考えられる。

(5) ミトコンドリア内膜タンパク質 Tam41 がカルジオリピン合成の鍵酵素であることを発見 ミトコンドリア内膜で合成されるカルジオリピンはミトコンドリアに特有のリン脂質であり、ミトコンドリア内膜のタンパク質複合体の機能に必須である。ここで鍵となる PA から CDP-DAG への変換酵素が当研究室で発見した Tam41 であることを見いだした。カルジオリピン合成経路の最後のミッシングリンクが同定されたことになる。

(6) ミトコンドリア膜間部のジスルフィドリレーシステム構成因子の構造決定 ミトコンドリア膜間部でタンパク質に特異的にジスルフィド結合を導入する Tim40-Erv1 システムに関して、酵母 Erv1 のコア部分の二量体の X 線構造を分解能 2.0Å で決定した。この構造に基づき、コアの外にある N 端ループ部分 (シャトルジスルフィドを含む) が Tim40 から Erv1 コア部分へと電子を伝達する仕組みを考察した。

(7) ノンストップミトコンドリアタンパク質の品質管理機構の解明 ミトコンドリアタンパク質の mRNA から終止コドンが失われると、できかけのタンパク質がリボソームをストールさせるとともに、ミトコンドリアのトランスロケータの孔も詰まらせてしまう。これは細胞にとって致死となること、Dom34/Hbs1 ができかけのタンパク質をストールしたリボソームから強制的にミトコンドリア内に吐き出させ、孔詰まりを解消することを見いだした。これまで知られていなかった「できかけのタンパク質の品質管理」が細胞の正常機能を保つ上で重要であることを示す結果である。

## 5. 今後の計画

現在の研究を進め、ミトコンドリアの膜構造に注目しつつ、ミトコンドリアタンパク質の交通管制システムの全貌とその分子機構を解明する。特に ERMES やコンタクトサイトの役割解明に力を注ぐ。またトランスロケータの膜内在性構成サブユニットの構造解析にも挑戦する。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Y. Tamura, S. Nishikawa, **T. Endo** et al. (2013) Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria. *Cell Metab.* in press
2. Y. Tamura, **T. Endo** et al. (2012) Phosphatidylethanolamine biogenesis in mitochondria: phosphatidylserine (PS) trafficking is independent of a PS decarboxylase and intermembrane space proteins, Ups1p and Ups2p. *J. Biol. Chem.* 287, 43961-43971
3. T. Shiota, Y. Tamura, **T. Endo** et al. (2012) The Tom40 assembly process probed using the attachment of different intra-mitochondrial sorting signals. *Mol. Biol. Cell* 23, 3936-3947
4. T. Izawa, S. Nishikawa, **T. Endo** et al. (2012) Role of Dom34/Hbs1 in non-stop protein clearance for normal organelle protein influx. *Cell Reports* 2, 447-453
5. T. Izawa, **T. Endo**, S. Nishikawa et al. (2012) Yos9p and Hrd1p mediate ER retention of misfolded proteins for ER-associated degradation. *Mol. Biol. Cell* 23, 1283-1293
6. T. Shiota, **T. Endo** et al. (2011) *In vivo* protein-interaction mapping of a mitochondrial translocator protein Tom22 at work. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 15179-15183
7. H. Yamamoto, **T. Endo** et al. (2011) Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 91-96
8. K. Yamano, **T. Endo** et al. (2010) Tom7 regulates Mdm10-mediated assembly of the mitochondrial import channel protein Tom40. *J. Biol. Chem.* 285, 41222-41231
9. K. Yagawa, S. Kawano, **T. Endo** et al. (2010) Structural basis for unfolding pathway-dependent stability of proteins: vectorial unfolding vs. global unfolding. *Protein Science* 19, 693-702

ホームページ等

<http://biochem.chem.nagoya-u.ac.jp/index.html>