

遠藤斗志也

名古屋大学大学院理学研究科・教授

ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワークの解明

§1. 研究実施体制

(1)「遠藤」グループ

① 研究代表者:遠藤斗志也 (名古屋大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

ミトコンドリアをハブとする構造機能ネットワークの解明

- ・トランスロケーターの動的機能ネットワーク
- ・ERMES 複合体を介するネットワーク
- ・クリステ膜構造の形成
- ・MICOS 複合体を介するネットワーク
- ・脂質合成・輸送系ネットワーク

(2)「岡」グループ

① 主たる共同研究者:岡 敏彦 (立教大学理学部、教授)

② 研究項目

ミトコンドリア内膜構造形成の分子機構

- ・クリステ膜構造の形成機構の解析
- ・MICOS 複合体を介するネットワークの解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

遠藤グループ

(1) 研究のねらい

トランスロケータ間の過渡的相互作用の全貌解明, ERMES 複合体とトランスロケータとの相互作用ネットワークの解明と因子の構造解析, LETM1 の酵母ホモログ Mdm38 と相互作用する因子の検索, MICOS 複合体とトランスロケータとの相互作用ネットワークの解明と因子の構造解析, ミトコンドリア-小胞体にまたがる脂質合成系の全体像と調節機構の解明, 関与する因子の構造解析, ミトコンドリア内, ミトコンドリア-小胞体間での脂質輸送機構の解明をめざす。

(2) 研究の概要・進捗状況と今後の見通し

1. トランスロケータの動的機能ネットワーク

1) トランスロケータサブユニット間およびアセンブリー因子との相互作用

部位特異的に光架橋性非天然アミノ酸 BPA を導入した Tom22 を酵母細胞内で過剰発現して架橋を行うと, Tom22 が TOM40 複合体に組み込まれる前に一過的にサイトゾル及び外膜のタンパク質と架橋産物を生ずる。サイトゾルの因子は Hsp70 分子シャペロンであったが, 外膜の因子は 2 種類から成り, 一つは外膜の内在性膜タンパク質のポリン (Por1) であった。Por1 がどのように TOB 複合体を介した Tom22 のアセンブリーに関わるのかを解析する。

2) トランスロケータサブユニットの機能・構造解析

外膜と内膜のトランスロケータ複合体を構成するサブユニットとして, Tom40, Tob55, Tim23, Tim17, Tim22 をとりあげ, それらの発現系の準備を行っている。

2. ERMES 複合体を介するネットワーク

1) ERMES 複合体の顆粒構造の解析

ERMES は集合して細胞あたり数個の巨大集合体をつくる。この集合の制御機構を調べるために, まず集合体数を定量的に測定する方法を確立し, 様々な培養条件, ミトコンドリアや小胞体の形態に異常を生ずる変異株内での集合体数を測定した後に, 集合体制御機構の解析へと展開していく。

2) ERMES 複合体と相互作用する因子の解析

ERMES構成因子と相互作用する因子を酵母SGA解析で検索したところ, 脂質合成経路の遺伝子とともに, 液胞やエンドソームのタンパク質遺伝子が多数得られた。これらの因子の細胞局在を調べていく。

3) ERMES 複合体の構造解析

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 2.3 Å 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, ここに脂質の可能性のある, 未同定の電子密度が見られた。脂質輸送アッセイ系を用いて, Mdm12 が脂質輸送に関わる可能性を直接検証するとともに, 疎水性空間に変異を入れた Mdm12 を作成していく。

3. クリステ構造の形成

1) LETM1/Mdm38 と相互作用する因子の解析

酵母 Mdm38 の SGA 解析の準備を進めている。

4. MICOS 複合体を介するネットワーク

1) MICOS 複合体と相互作用する因子の解析

ERMES 構成因子の SGA 解析から, MICOS 複合体の中心サブユニット Fcj1 が得られたので, ERMES と MICOS 複合体が構造機能的に連携するかどうか検討する。

2) MICOS 複合体サブユニットの機能・構造解析

MICOS 複合体構成因子の SGA 解析の準備を進めている。

5. 脂質合成・輸送系ネットワーク

1) Tam41/Ups1 の機能・構造解析 (A-1)

Tam41 を酵母から精製する系を確立して, CDP-DAG シンターゼ活性があることを証明した。大腸菌での発現系も検討する。Ups1 を Mdm35 と共発現する系, Ups2 をコムギ胚芽で発現する系を確立した。これらの構造機能解析を進める。

2) 脂質輸送アッセイ系の確立 (A-1)

ミトコンドリアと小胞体を含む単離オルガネラと ^{14}C -serine を用いて PS の合成を指標として脂質輸送を見るアッセイ系を確立した。このアッセイ系をさらに改善していく。

岡グループ

(1) 研究のねらい

リポソームを用いた *in vitro* 再構成系等を使って LETM1/Mdm38 複合体を介するクリステの膜構造の形成機構を解明する。また酵母 MICOS 複合体のホモログ解析により, ほとんど分かっていない哺乳動物のクリステ連結部-コンタクト部位形成に関わる因子と機構を明らかにする。

(2) 研究の概要・進捗状況と今後の見通し

1. クリステ膜構造の形成

1) LETM1 機能の再構成

人工膜リポソームを用いた LETM1 の *in vitro* 再構成系で観察される陥入膜の形成能と LETM1 の生体内での機能との関連性を検証するため, LETM1 の機能欠損ミスセンス変異の同定を行った。常染色体欠損により引き起こされるヒト Wolf-Hirschhorn 症候群の原因遺伝子の一つである LETM1 は, これまでに欠損変異のみが報告されているだけである。そこで, ヒト LETM1 遺伝子の酵母 *mdm38* 変異への相補能を用いて機能変異を同定した。その結果, 単変異 D360A と三重変異 R383A/G384A/M385A が相補能を失うことを見出した。また HeLa 細胞において, これらの変異体はミトコンドリアに正常に輸送されるが, LETM1 複合体の形成が著しく減少していることが明ら

かとなった。これらの変異の膜構造変換機能への影響の解析を行っていく。

2) LETM1 の構造解析

LETM1 の結晶化・構造決定へ向けて、LETM1 の全長タンパク質と可溶性ドメイン部分のカイコでの発現・精製を行った。発現・精製を続け、結晶化条件の検討を進めていく。

2. MICOS 複合体を介するネットワーク

哺乳動物の MICOS 複合体については、ヒトのゲノムデータベースの中から相同性検索で MICOS 複合体サブユニットと予想される3つの遺伝子をクローニングし、その発現を HeLa 細胞で確認した結果、2つの遺伝子産物(CHCHD6とAPOOL)の発現とミトコンドリア局在を明らかにした。さらに残りのサブユニットの同定とクローニングを進めるため、MICOS 複合体の精製を検討する。MICOS 複合体のコアサブユニットである Mitofilin について、HeLa 細胞内での発現、組換え体の発現・精製を検討していく。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

A-1. Yasushi Tamura, Yoshihiro Harada, Shuh-ichi Nishikawa, Megumi Kamiya, Takuya Shiota, Takuya Kuroda, Osamu Kuge, Hiromi Sesaki, Kenichiro Imai, Kentaro Tomii, and Toshiya Endo, “Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria”, Cell Metabolism. (in press)

A-2. Yasushi Tamura, Ouma Onguka, Kie Itoh, Toshiya Endo, Miho Iijima, Steven M. Claypool, and Hiromi Sesaki, “Phosphatidylethanolamine biogenesis in mitochondria: phosphatidylserine (PS) trafficking is independent of a PS decarboxylase and intermembrane space proteins, Ups1p and Ups2p.”, Journal of Biological Chemistry vol. 287, pp. 43961-43971, 2012

B-1. Kenta Onoue, Akihiro Jofuku, Reiko Ban-Ishihara, Takaya Ishihara, Maki Maeda, Takumi Koshiba, Takashi Itoh, Mitsunori Fukuda, Hidenori Otera, Toshihiko Oka, Hiroyoshi Takano, Noboru Mizushima, Katsuyoshi Mihara, and Naotada Ishihara, “Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology”, Journal of Cell Science vol. 126, pp.176-185, 2013