

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
- ・MICSO 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. 研究実施の概要

遠藤グループ

(1) 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) 研究の実施概要

1. トランスロケータの動的機能ネットワーク

- 1) 膜間部側から外膜に挿入される新規 N アンカー型外膜タンパク質の移行経路を発見した。
- 2) *in vivo* 部位特異的光架橋により, TOM40 複合体のサブユニット配置を明らかにした。Tom40-Tom22 が三量体として機能することを示した。

2. ERMES 複合体を介するネットワーク

- 1) 小胞体・ミトコンドリア間テザリング部位である ERMES 複合体の構成因子と機能的に関連する因子を酵母 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, 液胞の膜結合に関わる遺伝子が多数得られた。ミトコンドリアが液胞ともテザリング部位を形成する可能性を検討する。
- 2) ERMES 複合体のサブユニット 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。*in vitro* で脂質輸送アッセイ系を使って, Mdm12 が脂質輸送に関わる可能性を検討した。

3. MICOS 複合体を介するネットワーク

- 1) 外膜と内膜のコンタクトサイト形成の担う MICOS 複合体を構成する 6 種のサブユニットについて, *in vitro* インポート系を使って, 局在化経路を解析した。

4. 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, A-2)

PA (ホスファチジン酸) 輸送に関わる Ups1 を大腸菌内で Ups1 調節因子 Mdm35 と共発現する系を確立し, Mdm35, Ups1-Mdm35 の結晶化に成功した。Mdm35 については, 1.45 Å の分解能で X 線構造の決定に成功した。

2) 脂質輸送アッセイ系の至適化

ミトコンドリアと小胞体を含む単離オルガネラと ¹⁴C-serine を用いて脂質輸送を見るアッセイ系を確立したが, 細胞の培養条件などを検討し, 効率化をはかった。

岡グループ

(1) 研究のねらい

クリステ構造形成に係る LETM1/Mdm38 と MICOS 複合体の制御機構を明らかにすることで, ミトコ

ンドリア機能におけるクリステ構造の役割を解明する。

(2) 研究の実施概要

1. クリステ膜構造の形成

1) LETM1 の機能の試験管内再構成と構造解析; 本年度も引き続き, 人工膜リポソームと精製 LETM1 タンパク質を用いた膜陥入構造の試験管内再構成法の確立を目指す。急速凍結法に加え化学固定法を検討したが, リポソームの安定性が低いため, さらに条件検討を進める。LETM1 の結晶化・構造決定へ向けて, カイコ及び大腸菌で発現した可溶性ドメインの精製サンプルを用いて結晶化の条件検討を進める。

2) LETM1/Mdm38 と相互作用する因子の解析; 酵母 *mdm38* 変異と遺伝的に相互作用する遺伝子のスクリーニングを行い, ミトコンドリア機能に関わる 29 遺伝子を同定した。さらに解析を進め, LETM1/Mdm38 機能に直接働くミトコンドリアタンパク質を同定していく。

2. MICOS 複合体を介するネットワーク

MICOS 複合体コアサブユニットである Mitofilin は, 哺乳類に高く保存された PKA コンセンサス配列を持つ。この部位の変異体はリン酸化が消失し, MICOS 複合体形成が促進されていたことから, リン酸化に伴う複合体の解離が推定される。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国際)

A-1. Yasushi Tamura, Yoshihiro Harada, Shuh-ichi Nishikawa, Koji Yamano, 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* vol. 17, pp709-718, 2013 (doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.018)

A-2. Yasushi Tamura and Toshiya Endo “Unveiling the last missing link of the cardiolipin synthetic pathway in mitochondria” *Aging* vol. 6, pp392-393, 2013

A-3. Hiroaki Okamoto, Akiko Miyagawa, Takuya Shiota, Yasushi Tamura and Toshiya Endo “Intra-molecular disulfide bond of Tim22 maintains integrity of the TIM22 complex in the mitochondrial inner membrane” *Journal of Biological Chemistry* vol. 289, pp4827-4838, 2014 (doi: 10.1074/jbc.M113.543264)

A-4. Bytul Rahman, Shin Kawano, Kaori Yunoki-Esaki, Takahiro Anzai, and Toshiya Endo “NMR analyses on the interactions of the yeast Tim50 C-terminal region with the

presequence and Tim50 core domain” FEBS Letters vol. 588, pp678-684, 2014 (doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.037)

A-5. Jiyao Song, Yasushi Tamura, Tohru Yoshihisa, and Toshiya Endo “A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex” EMBO Reports, in press (2014)

B-1. Kei Okatsu, Midori Uno, Fumika Koyano, Etsu Go, Mayumi Kimura, Toshihiko Oka, Keiji Tanaka and Noriyuki Matsuda “A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment.” Journal of Biological Chemistry vol. 288, pp 36372-36384, 2013 (DOI:10.1074/jbc.M113.509653)