

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 平成24年10月～平成30年3月

研究代表者：遠藤 斗志也
(京都産業大学総合生命科学部、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本プロジェクトでは、ミトコンドリアタンパク質の配送を担うトランスロケータ群、ミトコンドリア内の膜構造制御因子群、まだほとんど分かっていない脂質の輸送を担う因子群、さらには他のオルガネラ膜構造とのコンタクト部位などについて、それらが連携するネットワークの全体像と働く仕組みについて、構造生物学に力点をおいて解明を目指した。このために、構造生物学的研究を中心に行う遠藤グループ、ミトコンドリアの膜構造の制御を中心に生化学・細胞生物学研究を行う岡グループ、脂質輸送および他のオルガネラとの連携を担う因子の探索と機能解明をめざして生化学・細胞生物学研究を行う田村グループが、緊密に連携して研究を進めた。

トランスロケータについては、ミトコンドリア外膜でタンパク質搬入口として働く TOM 複合体について、部位特異的光架橋法によりアミノ酸残基レベルの空間分解能でタンパク質間相互作用地図を作成することに成功し、複合体のチャンネルが通過するタンパク質の性質の違いに応じた通り道を用意していること、複合体が、完成後も構造や構成因子を変えることで新しいサブユニットを古いサブユニットと入れ替えて、完全な機能をもった複合体を維持していることを明らかにした (*Science* 2015)。これまで外膜の N アンカー型膜タンパク質はサイトゾル側から外膜に挿入されると思われていたが、デフォルト経路は外膜を通過して膜間部側から組み込まれるものであることを発見した (*EMBO Rep.* 2014)。

一方これまで不明であった脂質輸送についても、ミトコンドリアの外膜から内膜へとホスファチジン酸 (PA) を運ぶ Ups1 について、塩基性アミノ酸と疎水性アミノ酸が適切に配置されることで PA をしまい込むポケットやその入口をふさぐ蓋様構造があることを見出した (*Nature Commun.* 2015)。Ups1 が膜間部の水中を進む際は、Mdm35 が結合して複合体になり、内膜に達すると切り離される仕組みも明らかになった。また Ups1 のホモログの Ups2 が、Ups1 と同様の仕組みで、ホスファチジルセリン (PS) を外膜から内膜へ運ぶことも見いだした (*JCB* 2016)。一方 ER-ミトコンドリア間コンタクトを形成する ERMES が脂質輸送を担うかどうかについては大きな論争があったが、ERMES 構成因子の Mdm12 の X 線構造を決定して Mdm12 が脂質結合タンパク質であることを示す一方で、Mdm12-Mmm1 が ERMES における脂質輸送の最小機能ユニットであり、Mmm1 が重要な役割を果たすことを明らかにした。ERMES の脂質輸送能について、ERMES が実際 ER からミトコンドリアへの PS 輸送を担うことを示した (*Sci. Rep.* 2016)。本プロジェクト進行中にも、ERMES 以外に様々なオルガネラ間でコンタクトの存在が示唆されたが、その実体はまだほとんど解明されていない。そこで、コンタクト構成因子のスクリーニングをめざして、これらのコンタクトを split GFP で直接観察する実験系を確立した (*Sci. Rep.* 2018)。

MICOS 複合体はミトコンドリア内膜のクリステ構造形成に重要であるが、その主要サブユニット MIC60/MIC19 が PKA によりリン酸化されると、不良ミトコンドリア外膜への PINK1 (パーキンソン病の原因遺伝子産物) の蓄積を阻害すること、その結果ユビキチンリガーゼ Parkin のミトコンドリア標的化が抑制されるため、不良ミトコンドリアの品質管理が抑えられるという、全く新規の調節機構を見いだした (*Mol. Cell* 2015)。またクリステ陥入の引き金となる LETM1 について、人工膜リポソームと組換え LETM1 を用いて陥入の再構成に成功し、LETM1 変異体解析により、陥入機構の解明をめざした。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. Watanabe et al. *Nature Commun.* 2015

概要: ミトコンドリア外膜から内膜へリン脂質を輸送するタンパク質 Ups1-Mdm35 の遊離型及びリン脂質結合型の立体構造を決定し、Ups1 がいったん「脂質膜」に結合して

そこから運ぶべき脂質を引き抜き、次に Ups1-Mdm35 として「水中」を移動して目的地の「脂質膜」へ脂質を送り込むという、脂質輸送のメカニズムを解明した。細胞内で水に溶けない脂質が、誤送も遅配もなくスムーズに目的地に配送される、謎に満ちた脂質流通の仕組みの一端が明らかになった。

2. Shiota *et al.*, *Science* 2015

概要: TOM 複合体は、1000 種以上のミトコンドリアタンパク質搬入口として働く。部位特異的光架橋で Tom40 チャンネルと他のサブユニットや基質タンパク質との精密な相互作用地図の作成に成功した。Tom40 がつくる孔の内側には通過する基質タンパク質の種類に応じてカスタマイズされた通り道が複数用意され、孔の出口にはシャペロンが集められて基質タンパク質を受け渡していることが分かった。さらに TOM 複合体は 3 分子の Tom40 から成る「機能複合体」と 2 分子の Tom40 から成る「組込み用複合体」の間の動的平衡にあり、常に新しい Tom40 を TOM 複合体に組込み、正常機能を維持できることが明らかになった。

3. Akabane *et al.*, *Mol. Cell* 2016

概要: ミトコンドリア内膜のクリステ構造形成に重要な MICOS 複合体の主要サブユニット MIC60/MIC19 が PKA によりリン酸化されると、不良ミトコンドリア外膜への PINK1 の蓄積が阻害され、その結果ユビキチンリガーゼ Parkin のミトコンドリア標的化が抑制されることを見いだした。cAMP/PKA 経路が不良ミトコンドリアの品質管理に関与する、言い換えればミトコンドリア機能がミトコンドリアの外からのリン酸化シグナルにより調節されるという新規調節機構の発見である。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. Tamura *et al.*, *Cell Metab.* 2014; Watanabe *et al.* *Nature Commun.* 2015; Miyata *et al.* *J. Cell Biol.* 2016; Kawano *et al.* *J. Cell Biol.* under revision

概要: これまでほとんど手がついていなかったミトコンドリア内、ミトコンドリア-ER 間の脂質配送の仕組みがわかってくると、がんや糖尿病をはじめとする病気や、逆に原因不明であった難病に、実は脂質配送の異常に関わる例が見つかってくることが考えられる。実際、本研究で解析した出芽酵母の Tam41, Ups1-Mdm35 や Ups2-Mdm35 はヒトに至る様々な生物種間でよく保存されており、その増減がヒトの健康と深くかかわることが示されている。将来的には、ヒトを含む高等真核生物の脂質配送の全体像の解明を通じて、脂質の配送の欠陥が引き起こすヒトの病気の治療や、健康を保つ試みなどにつながることも期待される。(294 字)

2. Song *et al.* *EMBO Rep.* 2014; Shiota *et al.* *Science* 2015; Arakawa *et al.* *Sci. Rep.* 2016.

概要: 本研究で明らかになったミトコンドリアへのタンパク質搬入口複合体の働く仕組みは、ヒト等の高等生物における同様のメカニズムの理解に直結し、ミトコンドリアタンパク質の搬入と関連するパーキンソン病などの神経変性疾患や、難病で治療法開発が待たれているミトコンドリア病の病因メカニズム解明に資することが期待される。将来的には、ミトコンドリアへのタンパク質の取り込み効率の制御により、ミトコンドリア機能や細胞機能を制御することで、未開発だったミトコンドリア病の治療法開発に道筋をつけることや老化の予防に繋がることも期待される。(256 字)

3. Akabane *et al.*, *Mol. Cell* 2016

概要: cAMP/PKA 経路により不良ミトコンドリアの排除が制御されるという本研究の成果は、細胞内 cAMP 濃度をコントロールすることで不良ミトコンドリアの蓄積を解消し、若年性遺伝性パーキンソン病の症状改善を促す低分子化合物の探索への手掛かりとなることが期待される。(128 字)

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「遠藤」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
遠藤斗志也	名古屋大学→京都産業大学	教授	H24.10～H30.3
河野 慎	名古屋大学→京都産業大学	助教→研究助教	H25.4～H30.3
柚木 芳	名古屋大学→京都産業大学	研究員	H24.10～H30.3
渡邊 康紀	名古屋大学→京都産業大学→愛媛大学	研究員→客員研究員	H25.4～H29.5
松本 俊介	京都産業大学	研究員	H26.4～H30.3
荒磯 裕平	京都産業大学	研究員	H26.4～H30.3
須賀比奈子	京都産業大学→順天堂大学	研究員→客員研究員	H27.4～H30.3
丹羽 一	京都産業大学	研究員	H28.2～H30.3
植田 依里	名古屋大学→久留米大学	大学院生→客員研究員	H29.4～H30.3
阪上 春花	京都産業大学	研究員	H28.4～H30.3
竹田 弘法	京都産業大学	研究員	H27.4～H30.3
阪田 孝大	京都産業大学	大学院生	H28.4～H30.3
宋 紀瑤	名古屋大学	大学院生→研究員	H24.10～H29.5

研究項目

トランスロケータの動的機能ネットワーク

- ・トランスロケータサブユニット間の相互作用解析
- ・トランスロケータサブユニットの機能・構造解析
- ・トランスロケータ複合体の構造解析
- ・基質のラテラルリリースの解析
- ・外膜タンパク質の品質管理

ERMES 複合体を介するネットワーク

- ・ERMES 複合体の構造機能解析

MICOS 複合体を介するネットワーク

- ・MICOS 複合体と相互作用する因子の解析

脂質合成・輸送系ネットワーク

- ・Tam41, Ups1 の機能・構造解析
- ・脂質輸送アッセイ系の確立と新規脂質輸送因子の検索
- ・VAT-1 の構造解析

②「田村」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
田村 康	山形大学理学部	准教授	H24.10～H30.3
小島 理恵子	同上	研究員	H24.10～H30.3

田代 晋也	同上	研究員	H28.4～H30.3
鈴木 万葵	山形大学大学院理工学 研究科	大学院生	H28.4～H30.3
古田 詩唯奈	同上	大学院生	H28.4～H30.3
柿元 百合子	同上	大学院生	H29.4～H30.3
木村 啓介	同上	大学院生	H29.4～H30.3
工藤 真之祐	同上	大学院生	H29.4～H30.3

研究項目

ERMES複合体を介するネットワーク

- ・ERMES 複合体の顆粒構造の解析
- ・ERMES 複合体と相互作用する因子の解析
- ・新規オルガネラ間コンタクト因子の検索

脂質合成・輸送系ネットワーク

- ・Tam41/Ups1と相互作用する因子の解析
- ・Tam41, Ups1の機能・構造解析
- ・脂質輸送アッセイ系の確立と新規脂質輸送因子の検索
- ・リン脂質輸送(合成)因子の阻害剤検索

③「岡」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
岡 敏彦	立教大学理学部	教授	H24.10～H30.3
伊藤(松井)愛子	同上	PD	H25.4～H27.3
原 裕子	同上	アルバイト(実験 技術員相当)	H25.4～H25.10
川波(赤羽)しお り	同上	アルバイト(実験 技術員相当)	H26.4～H26.9
川波(赤羽)しお り	同上	PD	H26.10～H29.3
廣瀬宏美	同上	アルバイト(実験 技術員相当)	H27.4～H28.3
廣瀬宏美	同上	RA	H28.4～H30.3
亀山東光恵	同上	RA	H27.4～H30.3
加藤雅弘	同上	大学院生(M1)	H29.4～H30.3

研究項目:

クリステ構造の形成

- ・LETM1 機能の再構成
- ・LETM1・Mdm38と相互作用する因子の解析
- ・LETM1 の構造解析

MICOS 複合体を介するネットワーク

- ・MICOS 複合体と相互作用する因子の解析
- ・MICOS 複合体のサブユニットの機能・構造解析
- ・哺乳動物 MICOS 複合体の機能解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

国内

産総研(Paul Horton, 今井賢一郎), 九州大学(久下理), 東京都医学総合研究所(松田憲之), 東京大学(吉川雅英), 小野薬品工業

国外

モナシュ大学(Trevor Lithgow, 豪), スtockホルム大学(Arne Elofsson, スウェーデン), フライブルグ大学(Nikolaus Pfanner, 独), チュービンゲン大学(Doron Rapaport, 独), ジョンズホプキンス大学(瀬崎博美, 米), ミュンヘン大学(Roland Beckman, 独), NIH(Richard Youle, 米国)

§ 3 研究実施内容及び成果

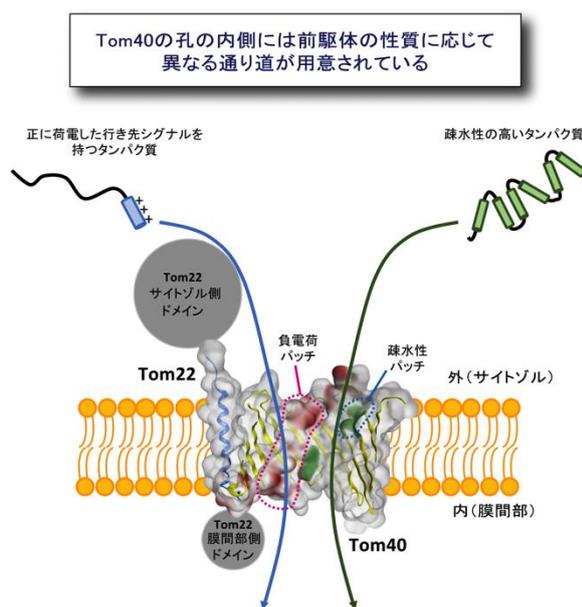
名古屋大学→京都産業大学・遠藤グループ(一部名古屋大学・阿部グループ, 山形大学・田村グループを含む)

3.1 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の相互作用解析(遠藤グループ)

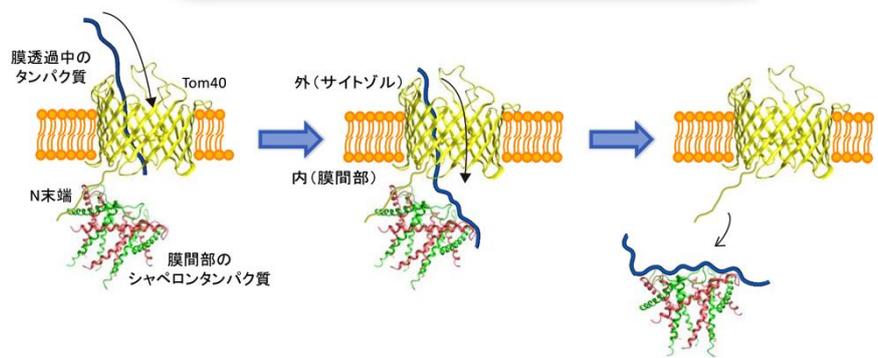
[実施方法・実施内容・成果] ミトコンドリア外膜トランスロケータ **TOM 複合体**の原子レベルの精密構造は得られていない。そこで **TOM 複合体**のインポートチャネルの本体である **Tom40** の構造予測を行った。**Tom40** は β バレル型膜タンパク質 **VDAC** (porin, ミトコンドリア外膜タンパク質) のファミリーに属し, β バレル型構造が予測されていたので, **VDAC** の精密構造を鋳型として, アミノ酸配列の類似性に基づく構造モデリングにより, 構造予測を行った。予測された構造は, これまでの生化学的知見と良く一致した。次に妥当性が示されたモデル構造に基づいて, **Tom40** と他のタンパク質との相互作用を調べるために, 酵母細胞内で **Tom40** の 100 箇所以上の部位に 1 つずつ光架橋性非天然アミノ酸のベンゾイルフェニルアラニン (BPA) を導入した。酵母細胞抽出液や単離したミトコンドリアに紫外線を照射すると, **BPA** は近傍のタンパク質と光化学反応によって架橋される。この架橋相手を, 抗体を用いて同定することで, **Tom40** のどの部位がどのようなタンパク質 (TOM 複合体の他のサブユニット, 膜間部のシャペロン, 通過する基質前駆体タンパク質等) の近傍にあるかを, アミノ酸残基レベル (10Å) の空間分解能でマッピングすること (相互作用地図の作成) が可能となる。

TOM40 複合体の機能に関する重要な論争として, 前駆体タンパク質の通り道の実体が何かという問題があった。膜透過する前駆体タンパク質は **Tom40** の「円筒形 β バレル構造の孔」を通るのか, 複数の **Tom40** 分子の β バレル構造が集合して作る「分子間の隙間空間」を通るのか, という問題である。今回, 前駆体タンパク質の外膜透過反応を停止させて **Tom40** に導入した **BPA** との架橋を調べたところ, **BPA** の反応部位が β バレル構造の内側に向いているときのみ, 前駆体タンパク質と架橋されることがわかった。このことから, 前駆体タンパク質は β バレル構造の孔の内側を通過して外膜を透過することがはじめて直接的に証明された。さらに前駆体タンパク質の種類を変えて, **Tom40** の孔の内側のどの部分と前駆体がコンタクトするかを調べたところ, 正に荷電したミトコンドリア行きシグナルをもつ前駆体は, **Tom40** の孔の内側の負に荷電したパッチ領域と接触しながら孔を通り抜け, 全体として疎水性の高い前駆体は **Tom40** の孔の内側の疎水性の高いパッチ領域と接触しながら通り抜けることがわかった。これらのパッチ領域は進化的に良く保存されていることもわかった。したがって, **Tom40** がつくる孔は 1000 種類に及ぶ様々な前駆体タンパク質を効率よく通すために, 孔の内側に前駆体タンパク質の性質に応じてカスタマイズされた通り道を複数用意していることが示された (Shiota *et al. Science*, 2015)。



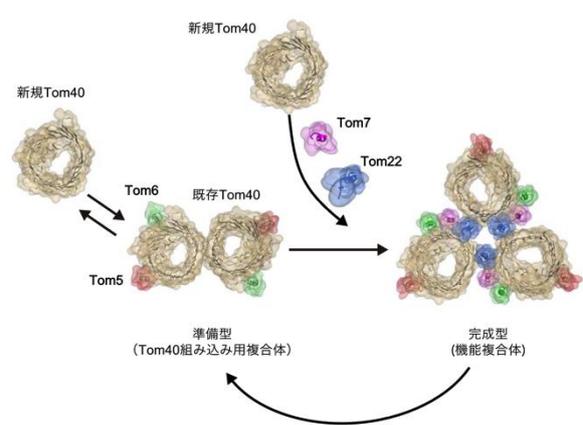
Tom40 のポリペプチド鎖の N 末端部分はβバレル構造形成には関わらないが、意外なことにβバレル構造の孔を外（サイトゾル）側から内（膜間部）側に向かって貫き、膜間部のシャペロンタンパク質と相互作用することがわかった。Tom40 の N 末端部分はシャペロンをβバレル構造の出口にあたる膜間部側に集めることにより、孔を通して膜間部に出てくるタンパク質を効率よくシャペロンに引き渡す働きをすることが明らかになった。

Tom40のN末端部分が膜間部で前駆体タンパク質の受取手のシャペロンタンパク質を集め、効率的な配送を行う



さらに TOM40 複合体は、Tom40 が 3 分子集まって孔が 3 つの三量体複合体を作ること、このとき Tom22 が Tom40 どうしを集合させる糊の役割を果たしていることがわかった。この三量体複合体は、糊の Tom22 が外れることで一部が壊れて Tom40 が 2 分子から成る孔 2 つの二量体複合体に可逆的に変換する、すなわち Tom40 は二量体と三量体の複合体間を往き来することがわかった。三量体複合体はタンパク質の透過チャンネル Tom40、糊の Tom22、そして受容体がすべて集まって、前駆体タンパク質を外膜透過させるために働く完成型（機能複合体）であり、一方二量体複合体は、ミトコンドリアに入ってきた新規 Tom40 を三量体複合体に組み込むための足場として働く準備型 (Tom40 組み込み用複合体) である。膜タンパク質複合体が、完成後も構造や構成因子を変えることで、新しいサブユニットを古いサブユニットと入れ替えて、完全な機能をもった複合体を維持していることが、はじめて具体的に証明された (Shiota *et al. Science*, 2015)。

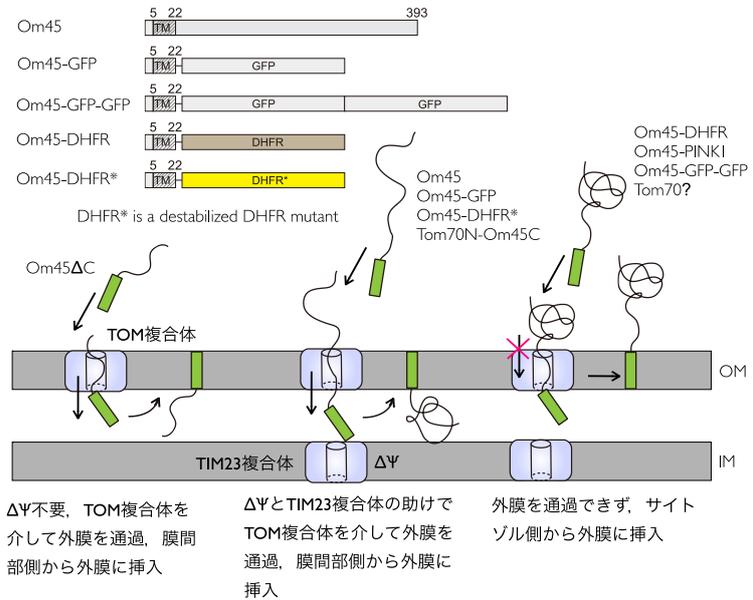
TOM複合体は完成型と準備型の間を往き来する



【成果の位置づけ及び類似研究との比較】ごく最近、アカパンカビの TOM 複合体のクライオ電子顕微鏡 (EM) 構造 (分解能 6.8 Å) が、Kühbrandt らのグループから報告された (Bausewein *et al. Cell* 170, 693-700)。出芽酵母の TOM 複合体は主として 3 量体であり、これが Tom22 を含まない 2 量体構造と動的平衡にあるが、アカパンカビでは、3 量体と Tom22 を含む 2 量体とが動的平衡にあり、2 量体はコア機能複合体であると著者たちは主張している。分解能が 6.8 Å であるため、各サブユニットの帰属、Tom40 のβバレル構造のβストランドの帰属などは、ほとんどすべてわれわれの架橋実験の結果に基づいている。言い換えれば、2 年先行したわれわれの架橋によるマッピングは中程度の分解能のクライオ EM 像に匹敵する構造情報を与えるものであったといえる。

(2) 基質のラテラルリリースの解析 (遠藤グループ, 田村グループ)

[実施方法・実施内容・成果] N アンカー型外膜タンパク質 Om45 が、従来考えられているサイトゾル側から外膜にアンカーされるのではなく、外膜を完全に通過し、続いて膜間部側から外膜に挿入されることを見出した (Song et al., *EMBO Rep* 2014)。さらに Om45 の移行経路は、外膜 TOM 複合体と内膜 TIM23 複合体に依存し、内膜の膜電位を必要とする全く新規の経路であることを明らかにした。膜電位は TOM 複合体の通過に必要な Om45 のアンフォールディングに必要であると考えられる (右下図)。N 端側の膜貫通 (TM) 配列は別の N アンカー型外膜タンパク質 Tom70 の TM 配列と入れ替えても同じ経路で輸送されるので、この経路は N アンカー型外膜タンパク質のデフォルト経路と考えられる。一方で、C 端ドメインが大きかったり、固くフォールドしている、TOM 複合体の通過が妨げられる。このとき例えばラテラルリリースで外膜に挿入されれば N アンカー型外膜タンパク質のトポロジーが逆転する。Tom70 はこの逆転経路によりサイトゾル側から外膜にアンカーされるトポロジーをとることが考えられる。問題は、βバレル構造の Tom40 の 1 番目と 19 番目の βストランドをつなぐ複数の水素結合が同時に切れて、βバレルがラテラルに開くかどうかである。



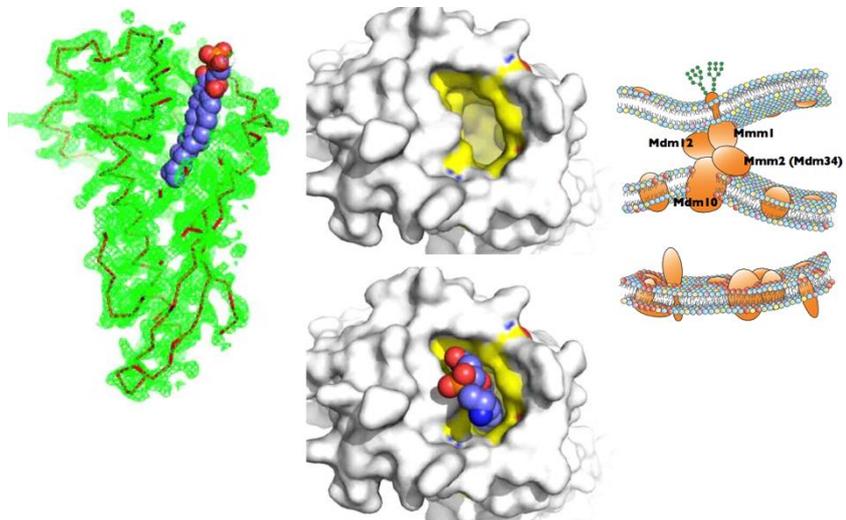
N-achonr 型外膜タンパク質の外膜挿入経路 (右側のケースが Tom40 チャネルからのラテラルリリースにあたる)

3.2 ERMES 複合体を介するネットワーク

(1) ERMES 複合体の構造機能解析 (遠藤グループ, 田村グループ)

[実施方法・実施内容・成果] 酵母細胞内でミトコンドリアと ER の物理的なコンタクト (テザリング部位) をつくる ERMES が脂質輸送に関わるかどうかを検証すべく、酵母 *K. lactis* の Mdm12 の X 線

構造を 2.3 Å の分解能で決定した (Kawano et al. *J. Cell Biol.*, revise 中; 右図)。Mdm12 には疎水性の深いポケットが外に向かって開いており、ここにリン脂質が結合していた。このリン脂質は大腸菌細胞膜の主要脂質のホスファチジルエタノールアミン (PE) であった。したがって Mdm12 が



脂質結合タンパク質であること、脂質の脂肪酸部分を認識して結合すること（頭部を認識しないので脂質の種類に対する特異性は低い）が明らかになった。

以上の構造情報は Mdm12 が脂質結合タンパク質であることを示すが、このことは必ずしも単独で脂質輸送能を示すことを意味しない。Mdm12 は Mmm1 と複合体を形成するので、Mdm12, Mmm1 (MBP との融合タンパク質), Mdm12-Mmm1 複合体の各々について、*in vitro* でリポソームを用いた脂質輸送アッセイ系を使って、Mdm12 と Mmm1 が脂質輸送に関わる可能性を検討した。大腸菌の発現系から精製した Mdm12, Mmm1 (MBP との融合タンパク質), Mdm12-Mmm1 複合体の、*in vitro* リポソーム間の脂質輸送能は Mdm12 < Mmm1 << Mdm12-Mmm1 の順番であった。Mdm12 の構造に基づいて Mmm1 の構造をホモロジーモデリングで予想し、それに基づいて Mmm1 の予想脂質結合ポケットの変異体を作成、Mmm1, Mdm12-Mmm1 複合体の *in vitro* でのリポソーム間の脂質輸送能を調べたところ、変異体ではともに輸送能が低下しており、Mdm12-Mmm1 複合体の脂質輸送能は Mmm1 の脂質結合が重要な役割を担うことがわかった。そこで、新規に開発した酵母細胞から単離した ER・ミトコンドリア膜画分を用いた ER-ミトコンドリア間ホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE) 輸送アッセイ系⁴⁾を用いて、ERMES による脂質輸送能を調べたところ、やはり Mmm1 の変異株では PS の輸送が遅れた。したがって ERMES において、Mdm12-Mmm1 は脂質輸送の最小機能ユニットであり、Mmm1 が重要な役割を果たすことが分かった。

【成果の位置づけ及び類似研究との比較】 本研究成果を論文投稿中に、出芽酵母 *S. cerevisiae* の Mdm12 の X 線構造が論文発表された (Jeong *et al.* *EMBO Rep.*, 2016)。われわれの *K. lactis* の Mdm12 の X 線構造と基本的には良く似ているが、ドメインスワッピングが起こるなど結晶化のアーテファクトがあり、それに基づいて誤った議論を行っている。われわれの脂質結合型 Mdm12 の構造ではドメインスワッピングは起こっていない、より生理的条件下での Mdm12 の脂質結合様式についての議論が可能である。さらに、われわれは Mdm12 単独ではなく、Mmm1, Mdm12-Mmm1 複合体についても *in vitro* で定量的な脂質輸送活性を測定できており、その結果 Mdm12 単独ではきわめて脂質輸送能が低いこと、ERMES が脂質輸送を担うためには Mmm1-Mdm12 等サブユニット間の巧妙な連携が必要なことが明らかになった (*J. Cell Biol.*, 2018)。今後、ERMES において、Mdm12 が Mmm1 (ER 側), Mdm34 (ミトコンドリア側) とどのように協同して脂質を効率よく輸送するのか、精製タンパク質から成る *in vitro* 再構成系をつくるなどして解析を進めていきたい。

3.3 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 (遠藤グループ, 田村グループ)

【実施方法・実施内容・成果】 MICOS 複合体は、ミトコンドリア内膜でクリステジャンクション (CJ) を形成するとともに、外膜・内膜接合部位を形成するミトコンドリア内の構造体である。MICOS 複合体は、出芽酵母では Mic10, Mic12, Mic19, Mic26, Mic27, Mic60 の 6 種のサブユニットから構成され、Mic10, Mic12, Mic26, Mic27 から成る Mic10 サブ複合体と Mic19, Mic60 から成る Mic60 サブ複合体から成り立っている。これらのサブユニットの内 Mic60 は典型的なプレ配列を持ち、TOM-TIM23 経路で内膜に移行すると考えられるが、他のサブユニットはプレ配列を持たず、どのような因子と相互作用し、どのような経路で内膜に移行するかは不明であった。そこで、*in vitro* で各サブユニットを合成し、ミトコンドリアへのインポート実験を行うことで、各サブユニットの移行経路を解析した。

3.4 脂質合成・輸送系ネットワーク

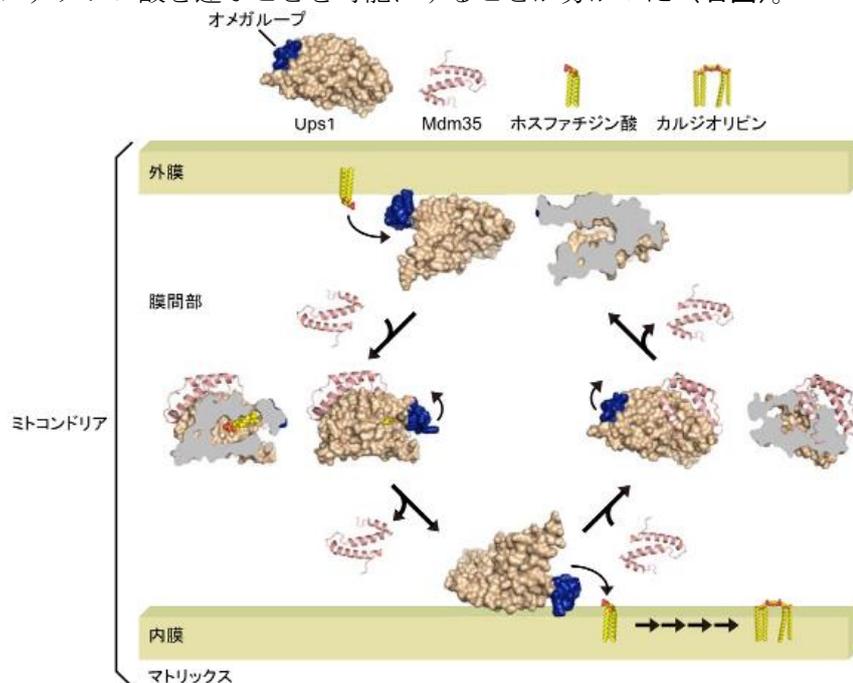
(1) Tam41, Ups1 の機能・構造解析 (遠藤グループ, 田村グループ)

【実施方法・実施内容・成果】 Ups1-Mdm35 複合体の立体構造を決めることで、ホスファチジン酸を運ぶメカニズムを明らかにすることを試みた (Watanabe *et al.*, *Nature Commun.* 2015)。Ups1-Mdm35 複合体の結晶を作成し、X 線結晶構造解析により、Ups1-Mdm35 複合体の立体構造を決定した。その結果、Ups1 に Mdm35 が抱きつくように結合することで Ups1

の立体構造が安定化されていること、Ups1 にはプラスに荷電した深い「ポケット」が形成されていることが分かった。ポケットの入り口には、オメガグループと呼ばれる柔軟性に富んだループ構造があって、これがあたかも蓋のように入り口を塞いでいた。

さらに、Ups1-Mdm35 複合体のホスファチジン酸結合型の立体構造の決定に成功した。ホスファチジン酸は、水に溶けにくいアシル基の「尾部」とマイナスの電荷を持つリン酸基の「頭部」から成る分子であり、ホスファチジン酸は Ups1 のポケットに頭部から入り込み、ポケット内のプラスの電荷を持つアミノ酸残基にプラスとマイナスの電荷が引き合う形で結合していることが分かった。また、変異体を用いた解析から Ups1 のポケットを塞いでいたオメガグループと、ポケットの入り口付近及び奥に存在しているプラスの電荷を持つアミノ酸残基が、実際にホスファチジン酸の膜間輸送に重要であることが明らかになった。以上の結果から、まず Ups1 のポケットの入り口のプラスの電荷が、外膜のホスファチジン酸のマイナスに荷電した頭部をポケット入り口に導き、ポケット内部のプラスの電荷が頭部をポケット内奥深くに引き込む。続いてオメガグループがポケットに蓋をしてホスファチジン酸を水から隔離することで、Ups1 がコンテナトラックのように外膜から内膜へと、水の区画を越えてホスファチジン酸を運ぶことを可能にすることが分かった（右図）。

Ups1-Mdm35 複合体が外膜からホスファチジン酸を積込むとき、次に内膜で荷下ろしするとき、Ups1 は外膜や内膜と直接結合する必要はある。Ups1-Mdm35 複合体は水に良く溶け、水の区画を自由に移動できるが、膜に結合するときは Mdm35 を解離させ、Ups1 単独の積込み型（荷下ろし型）になるらしいことが示唆されていた。そこで明らかになった Ups1-Mdm35



複合体の立体構造に基づいて Ups1 と Mdm35 を共有結合で繋ぎ、両者が解離できない形（水中輸送型に固定）にした。するとこの状態の Ups1 は膜への結合が弱くなること、ホスファチジン酸の積込みや荷下ろしが遅くなり、結果としてホスファチジン酸の輸送能が低下することを見出した。したがって、ホスファチジン酸の外膜から内膜への効率的な輸送には、Mdm35 の切り離し（解離）を伴った Ups1 の膜への結合（水中輸送型から膜上での積込み（荷下ろし）型への変換）が重要であることが示唆された（右上図）。このように二つのタンパク質の結合・解離により脂質の輸送が制御されるメカニズムはこれまでに例がなく、新規のメカニズムであると言える。

ミトコンドリア外膜内膜間でホスファチジン酸 (PA) を輸送する Ups1-Mdm35 のホモログ Ups2-Mdm35 について、*in vitro* で質量スペクトル測定によりポソーム間脂質輸送実験を行った。Ups2-Mdm35 は PA よりも PS に対して高い輸送活性を示した。また、Ups1-Mdm35 による PA 輸送で重要だった Ups1 の Ω ループを Ups2 で欠失させると、やはり PS 輸送活性が失われた。これらの結果は久下(九大)らによる *in vivo* での Ups2 の機能に関する実験結果と良く一致し、Ups2-Mdm35 はミトコンドリア外膜内膜間で PS を輸送することが明らかになった (Miyata *et al.*, *J. Cell Biol.* 2016)。現在、Ups1 と Ups2 の基質特異性を構造レベルで明らかにすべく、Ups2-Mdm35 および PS との

複合体の構造決定を試みている。具体的には、Ups1 の構造に基づいて、Asn28 と Gly159 に相当する *K. marxianus* の Ups2 について Mdm35 との融合タンパク質を作製、その Asn27 と Gly162 を Cys 残基に置換し、ジスルフィド架橋を形成させることで結晶化に向けた強固な構造を形成するコンストラクトを作製した。分子内ジスルフィド架橋の形成を SDS-PAGE により確認し、精製した融合タンパク質を用いて得られた結晶について、4.1 Å 分解能の回折データを得たので、Ups1-Mdm35 複合体の結晶構造をモデル分子とした分子置換法により位相決定を試みている。格子定数から非対称単位中に 5 もしくは 6 分子の融合タンパク質が含まれることが予測され、その内 3 分子を発見した ($R/R_{\text{free}} = 0.45/0.47$)。

[成果の位置づけ及び類似研究との比較] Ups1-Mdm35 の構造については、われわれも含めて同時に 3 つのグループから論文発表がなされた。他のグループの論文は主として構造解析が中心であるが、われわれは機能解析において一步先んじた内容となった。Ups2-Mdm35 の PS 輸送機能については、Langer らのグループからも同時に論文発表がなされた。われわれの論文では、酵母の diauxic シフトに伴いミトコンドリア量が増大するときに Ups2-Mdm35 レベルが上がり、ミトコンドリア形成に必須の PE を供給するために PS 輸送能が上がることを示すもので、Ups2-Mdm35 機能の生理的意義について特に重要な発見を含んでいる。

名古屋大学→山形大学・田村グループ

3.5 ERMES 複合体を介するネットワーク(山形大学・田村グループ)

(1) ERMES 複合体の顆粒構造の解析(田村グループ)

[実施方法・実施内容・成果] 酵母におけるミトコンドリアと ER のテザリング構造である ERMES 複合体は、その構成因子を GFP 融合タンパク質として発現すると、ケイ光顕微鏡下で一細胞あたり数個の顆粒として観察される。本研究では、ミトコンドリアの融合分裂が ERMES 顆粒構造形成に果たす役割の解析を行い、ミトコンドリアが融合できなくなると、ERMES 顆粒構造の数が増加し、顆粒構造の大きさが小さくなること、逆にミトコンドリアが分裂できなくなると、ERMES 顆粒構造の数が減少し、顆粒構造が大きくなることを見いだした。またミトコンドリアの融合分裂を同時にできなくすると、ERMES 顆粒はミトコンドリア分裂を阻害したときと同様に、数が減少し、顆粒 1 つあたりの大きさが大きくなった。同様の現象は、ミトコンドリア分裂阻害剤 Mdiv-1 存在下でも観察された。これらの結果から、ミトコンドリア融合と分裂がアンタゴニスティックに、ERMES 顆粒の数と大きさに影響することがわかった。

[成果の位置づけ及び類似研究との比較] これまでに ERMES 複合体のサブユニットの一つである Gem1 が欠損すると ERMES 複合体の顆粒構造の数が減少することや(Kornmann *et al.*, *PNAS*, 2011)、ミトコンドリア・液胞間のテザリング因子である Vps39 や、ミトコンドリア分裂因子 Dnm1 などが欠損すると逆に ERMES の顆粒の数が増加することが報告されていた(Elbaz-Alon Y, *et al. Dev. Cell*, 2014)。しかし実際にわれわれが ERMES 顆粒の数を観察したところ、*vps39Δ*では ERMES 顆粒の数は野生型とほとんど変わらず、*dnm1Δ*株においても、ERMES 顆粒の数が野生型に比べ減少するという、過去の報告とは異なる結果が得られた。共焦点顕微鏡を用い細胞全体の ERMES 顆粒の数と大きさを定量的に観察した本研究により、真の ERMES 顆粒形成機構の一端が明らかになった。

(2) ERMES 複合体と相互作用する因子の解析(田村グループ)

[実施方法・実施内容・成果] ERMES 欠損株が示す強い増殖阻害を過剰発現によって回復させるマルチコピーサプレッサー因子を探索し、転写因子 Mga2, Spt23 を同定した。これらの転写因子は $\Delta 9$ 脂肪酸不飽和酵素 Ole1 の転写を活性化することが報告されていた。そこで Ole1 の過剰発現も同様に ERMES 欠損株の増殖阻害を回復させるか検討したところ、Ole1 の過剰発現が部分的に ERMES 欠損株の増殖阻害を抑制することを確認した(Kojima *et al. FEBS Lett.* 2016)。次に ERMES 欠損株で転写が促進される遺伝子をマイクロアレイ解析により調べたところ、脂質輸送因

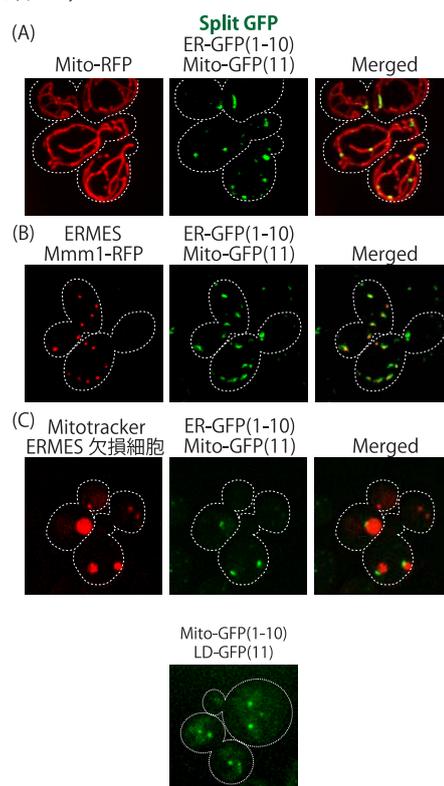
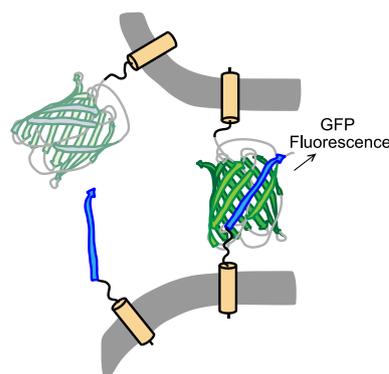
子として報告のあるヒトのオキシステロール結合タンパク質 (oxysterol binding protein (OSBP)) と相同性のあるタンパク質 Hes1 の転写が約 18 倍に上昇していることがわかった。現在 Hes1 の組換えタンパク質を大量調製し、その脂質輸送活性の検討を行っている。また Hes1 の結晶化も試み、2.5Å 以上の回折像が得られているが、まだ結晶のサイズが小さく、構造決定には至っていない。

【成果の位置づけ及び類似研究との比較】ERMES 構成因子と遺伝学的に相互作用する因子は、ERMES とオーバーラップする機能を有する可能性がある。実際にミトコンドリアと液胞のテザリング因子 Vps39 は、ERMES と遺伝学的に相互作用する因子として同定されている。本研究で独自に同定された ERMES と相互作用する因子の解析を進めることによって、細胞内リン脂質輸送機構の理解が進むことが期待される。

(4) 新規オルガネラ間コンタクト因子の検索 (田村グループ)

【実施方法・実施内容・成果】未知のオルガネラ間コンタクトが存在するかを検討するためには、生細胞中でオルガネラ間相互作用を検出する系が必須となる。そこで、split-GFP (GFP の N 末端の 1 ~ 10 番目のβストランドから成る分子と、11 番目のβストランド分子のペアで、これら 2 分子が近接した時のみ GFP 分子が再構成されてケイ光を発する) を異なるオルガネラ膜上に発現させ、オルガネラ間相互作用部位を GFP のケイ光で可視化できるかを検討した (右図, Kakimoto et al., *Sci. Rep.* 2018)。オルガネラ間相互作用がよく研究されているミトコンドリア外膜と ER 膜に split-GFP 分子を発現させてケイ光顕微鏡で観察したところ、ERMES 複合体と同様に、ドット状の再構成 GFP のケイ光パターンが検出された。また、split-GFP のシグナルが ERMES 複合体と共局在することが確認され、GFP 分子が既知のオルガネラ間コンタクトで再構成されることがわかった。split-GFP がオルガネラ間コンタクトの検出に有効であることが示されたので、ミトコンドリア・ER 以外の異種オルガネラの組み合わせについても split-GFP 分子を発現させたところ、ミトコンドリアと液胞、ペルオキシソーム、脂肪滴 (LD) 間において再構成 GFP のドット状シグナルが検出された。出芽酵母では、ミトコンドリアと脂肪滴間のコンタクトはこれまで報告されていなかったが、今回はじめてその存在が示唆されたことになる。さらに ER と液胞、ペルオキシソーム、脂肪滴間や、脂肪滴と液胞、ペルオキシソーム間でも再構成 GFP のシグナルが検出された。一方液胞とペルオキシソーム間には GFP シグナルは検出されなかった。これらの結果から、各オルガネラが様々なオルガネラと特異的にコンタクトを形成することが明らかになった。

【成果の位置づけ及び類似研究との比較】これまでに出芽酵母におけるオルガネラ間コンタクト構成因子として、ミトコンドリア・ER 間の ERMES や、ミトコンドリア・液胞間の vCLAMP、核と液胞間の NVJ などが同定されている。これらの結果から、未だコンタクトが報告されていないオルガネラ間にも、テザリング因子が存在することが予想されるが、生細胞中でのオルガネラ間コンタクトを評価する手法がこれまで存在しなかった。split-GFP のシグナルを指標としてオルガネラ間コンタクトを定量的に評価する本実験系を用いて、オルガネラ間コンタクトを構成する因子やその調節機構について、研究が大きく進展することが期待される。



3.6 脂質合成・輸送系ネットワーク

(1) Tam41/Ups1 と相互作用する (関連する) 因子の解析 (田村グループ, 遠藤グループ)

[実施方法・実施内容・成果] われわれの研究 (Tamura *et al.*, *Cell Metab.*, 2013; Watanabe *et al.*, *Nature Commun.*, 2015; Miyata *et al.*, *JCB*, 2016) により, カルジオリピン合成の分子機構の理解は格段に進んだが, ホスファチジン酸 (PA) 輸送因子である Ups1-Mdm35 に依存しない未知のカルジオリピン合成経路が未解明の問題として残った。Ups1 が欠損すると PA をミトコンドリア内膜に輸送できなくなるため, カルジオリピン (CL) の合成が著しく低下する。一方 Ups2 を欠損するとホスファチジルセリン (PS) を内膜に輸送できなくなるためホスファチジルエタノールアミン (PE) の合成が低下する (PE は PS を前駆体としてミトコンドリア内膜の酵素 Psd1 によって合成される)。意外なことに, Ups1 と Ups2 を両方欠損した場合, PE は減少したままであるが, CL 量が野生型と同程度に回復してしまう (Tamura *et al.*, *JCB*, 2009)。この結果は, Ups1, Ups2 が両方欠損した際に Ups1 に依存しない PA 輸送経路が活性化するか, PA 以外のリン脂質から CL が合成される経路が活性化することを示唆している。このようなオルタナティブな CL 合成経路に関与する因子は, *ups1Δups2Δ* 株, もしくは *mdm35Δ* 株 (Ups1 と Ups2 のミトコンドリア移行が阻害される) の増殖において重要と予想される。

[成果の位置づけ及び類似研究との比較] CL をはじめ適切な脂質合成は細胞機能に必須であることから様々なバックアップ経路が用意されているが, その多くは不明である。またミトコンドリア内膜構造と脂質合成の関係もこれまでほとんど分かっていなかった。今回得られた結果はたとえばタンパク質の含有量が脂質量を上回る内膜上において, 効率よく脂質合成を行うための場 (ドメイン) が存在する可能性を示しており, 新たな研究分野を開く突破口となる可能性がある。

(2) Tam41/Ups1 の機能・構造解析 (田村グループ, 遠藤グループ)

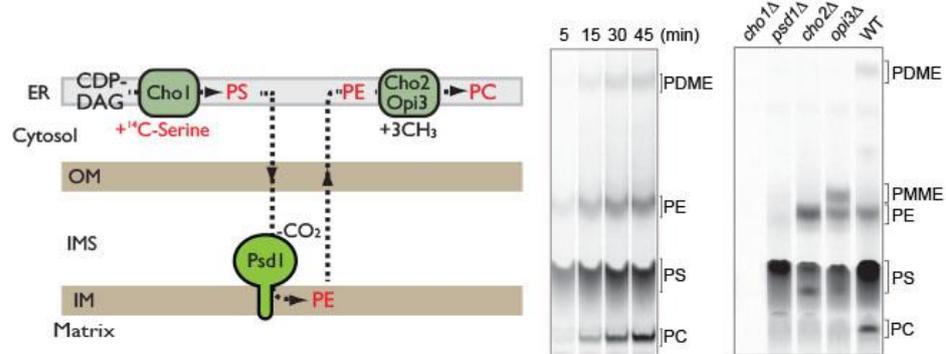
[実施方法・実施内容・成果] われわれがミトコンドリア内膜のトランスロケータ TIM23 複合体のアセンブリーに重要であることを明らかにしていた因子 Tam41 (Tamura *et al.* *JCB*, 2006) が, カルジオリピン (CL) 合成に関与すると予想し, Tam41 がホスファチジン酸 (PA) を CDP-ジアシルグリセロールに変換する酵素であるか検討した。出芽酵母細胞から Tam41 を精製し, 精製 Tam41 と PA を CTP 存在下でインキュベートしたところ, CDP-DAG の合成が確認され, Tam41 がカルジオリピン合成の初期ステップに関与する, ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素であることを証明した (Tamura *et al.*, *Cell Metab.* 2013)。続いて様々な生物種の Tam41 について大腸菌内での発現と精製, 結晶化を試みた。

[成果の位置づけ及び類似研究との比較] この発見以前は ER の CDP-DAG 合成酵素である Cds1 が ER だけでなくミトコンドリアにも局在することでカルジオリピン合成に関与すると考えられていた。Cds1 は原核生物で広く保存される複数回膜貫通型タンパク質であるが, Tam41 は表在性膜タンパク質で膜貫通ドメインを持たず, 原核生物にはほとんど存在しない。このように Cds1 とは構造も起源も異なる Tam41 が, 同じ酵素活性を持つことは進化的にも非常にインパクトの大きい発見であった。

(3) 脂質輸送アッセイ系の確立と新規脂質輸送因子の検索 (田村グループ, 遠藤グループ)

[実施方法・実施内容・成果] オルガネラ間リン脂質輸送機構の解明が遅れている原因の一つとして, リン脂質輸送を解析するための適切な *in vitro* 実験系がない事があった (*in vivo* では様々なバックアップ経路の存在, adaptation の存在などでノックアウト実験の結果を単純に解釈することが困難な場合が多い)。そこで出芽酵母の膜画分を用いた, 小胞体・ミトコンドリア間リン脂質輸送を定量的に評価できる実験系を構築した。細胞の培養条件, 膜画分の調製条件や, CTP, S-アデノシルメチオニン, 塩などの濃度を最適化することで, 再現性良く ER-ミトコンドリア間リン脂質輸送を評価できる実験系の構築に成功した。この実験系を用いて, ER・ミトコンドリア間コンタクトである ERMES 複合体が, 小胞体からミトコンドリアへの PS 輸送に重要な役割を果たす事を明らかにした (Kojima *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016)。

[成果の位置づけ及び類似研究との比較]これまで、ERMES がリン脂質輸送に重要であるという報告 (Kornmann et al., Science, 2009) と、リン脂質輸送には関与しないという報告 (Nguyen et al. Traffic, 2012; Voss et al., JCS, 2012) があり、ERMES による脂質輸送については議論が分かれていた。In vivo で ERMES 構成因子を欠失させても、ミトコンドリアと他のオルガネラ(液胞)とのコンタクトを増やすことで脂質輸送を回復するバックアップ経路が備わっているため、ERMES の欠損を、細胞を用いたノックアウト実験で評価することが難しかった。しかし本研究のような、in vitro のアッセイ系を用いることにより、ERMES の欠損を直接評価できるようになり、ERMES の脂質輸送機能に関する論争に終止符を打つことができた。



(6)リン脂質輸送

(合成) 因子の阻害剤検索 (田村グループ)

[実施方法・実施内容・成果] 東京大学創薬機構の化合物ライブラリ (9,600 種類) を用いて、リン脂質合成もしくは ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送反応を阻害する化合物の探索を行った。具体的には、細胞の生育に必須のリン脂質ホスファチジルエタノールアミン (PE) の合成が、ミトコンドリアのみで起こるように遺伝的に改変した酵母株 (*pdr1Δpdr3Δpsd2Δeki2Δ* 株) の生育を特異的に阻害する化合物を探索した。一次スクリーニングの結果、10 種類の化合物を選別し、さらにこれ等の化合物を異なる濃度で細胞に作用させて、濃度依存的に細胞増殖阻害効果を示す 4 種類の化合物を選別した。この 4 種類の化合物の中から、大量に購入が可能であった 3 種類の化合物を加えた寒天培地上で酵母細胞を生育させ、*pdr1Δpdr3Δpsd2Δeki2Δ* 株の増殖が、コントロールの *pdr1Δpdr3Δ* 株よりも顕著に遅くなることを確認した。さらに実際に得られたこれらの化合物が、リン脂質の合成や輸送を阻害するかを、in vitro リン脂質合成輸送実験により検討したが、リン脂質の合成、輸送ともに阻害はされていない。むしろ 1 種の化合物についてはリン脂質合成が促進しているように見えた。今回使用した化合物ライブラリはパイロットスクリーニング用の比較的小規模なライブラリであるため、今後化合物の数を増やしてスクリーニングを行うことで、これまでに報告例のないリン脂質合成、輸送反応の阻害剤を単離できることが期待される。

[成果の位置づけ及び類似研究との比較] リン脂質の合成、輸送反応の阻害剤はこれまでに報告されていない。出芽酵母を生きた試験管として用いることで、リン脂質合成輸送の阻害剤を単離できれば、新たな研究ツールの開発や、リン脂質合成輸送を調節することによる薬剤の開発に応用でき、インパクトの大きい成果となることが期待される。

立教大学・岡グループ

3.7 クリステ構造の形成

(1) LETM1 機能の再構成 (岡グループ)

[実施方法・実施内容・成果] LETM1 (酵母ホモログは Mdm38) は、ミトコンドリア内膜の陥入を促すことでクリステ形成に関わると考えられている因子である。われわれは既に人工膜リポソームと LETM1 の組換えタンパク質を用いた in vitro 再構成系を用いて、人為的な膜陥入構造の形成には成功していた。そこで次の段階として、LETM1 機能と膜陥入形成能との関係をより詳細に理解するために、LETM1 の機能欠損ミスセンス変異の選別を行った。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 LETM1 の酵母ホモログが Mdm38 であることを利用して、ヒト LETM1 遺伝子の酵母 *mdm38* 変異への相補能を用いて LETM1 の機能変異を同定した。その結果、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 LETM1 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分かった。

LETM1 機能がクリステ構造形成に関わることをさらに詳細に解明するため、Flp-In システムにより機能欠損変異体の遺伝子を 1 コピーだけ挿入したヒト 293 細胞を樹立した。内在性 LETM1 の RNA 干渉法による発現抑制と変異 LETM1 遺伝子の発現量を検討したが、LETM1 の半減期が長いいため内在性 LETM1 と導入した LETM1 との置き換えが上手くできず、導入した野生型 LETM1 でさえクリステ構造形態の回復は見られなかった。そのため、酵母 *mdm38* 変異株に野生型と変異 LETM1 遺伝子を発現させ、クリステ構造の形成回復を確認した。以上の結果は、LETM1 が新規の膜形成を司るタンパク質であることを示している。

(2) LETM1・Mdm38 と相互作用する因子の解析(岡グループ, 遠藤グループ, 田村グループ) [実施方法・実施内容・成果] 酵母 *mdm38* 欠損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、合成致死となる 224 個の遺伝子を同定したが、ミトコンドリア機能に関わる遺伝子は 36 個だけであった。そこで、2 種の機能欠損 *mdm38* ミスセンス変異株を用いて非発酵性培地での生育遅延を指標として再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。(遠藤・田村グループとの共同研究) その 29 遺伝子の中で、哺乳類に相同遺伝子が存在し、まだ機能未知だがミトコンドリア機能に関連すると考えられる 8 個の遺伝子を絞り込んだ。今後は、これらの因子の LETM1 相互作用やクリステ構造形成への役割を検討する予定である。

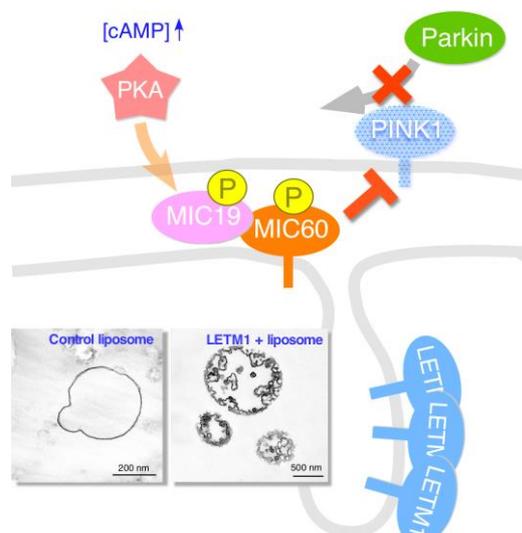
[(1) ~ (2) の成果の位置づけ及び類似研究との比較] 本研究により、人工リポソームを用いて初めて膜陥入構造の作成に成功した。さらに酵母を用いた電子顕微鏡観察により、この膜陥入構造形成能が LETM1 本来の *in vivo* 機能であることも証明した。今後得られる結晶構造の情報を基に、膜陥入構造の大きさや継続時間を変化させる変異 LETM1 タンパク質の作成を目指す。

これまでの類似研究では可溶性タンパク質を用いて人工膜形状を変化させたのに対し、本研究では膜貫通タンパク質である LETM1 を用いて再構成に成功した点で大きく異なる。さらに、既存のクリステ構造形成関連因子である呼吸鎖複合体や MICOS 複合体などがタンパク質複合体である一方、LETM1 は単一タンパク質のみで膜を変形できる大きなメリットも持つ。この 2 つの特徴は、多様で安定な人工リポソームを簡易に作成することに大きく貢献でき、ドラッグデリバリーへの応用にも期待ができる。また、結晶構造の情報を基に膜陥入の大きさや継続時間の異なる変異 LETM1 タンパク質を作成することで、リポソームの表面積と体積の比率を自由に調節でき、生体内での浸透圧耐性などの付加価値を付与することも可能となる。

3.8 MICOS 複合体を介するネットワーク

(1) MICOS 複合体のサブユニットの機能・構造解析 (岡グループ)

[実施方法・実施内容・成果] MICOS 複合体の主要サブユニットである MIC60 と MIC19 の相互作用の構造情報を得るため、既に報告がある MIC19 と PKA のリン酸化部位(Ser528)を含む MIC60 の中央部分(371-590 アミノ酸残基)を大腸菌で発現し、複合体としての構造解析を試みた。しかし、精製した MIC19 と MIC60(371-590) は、既知の報告と異なり安定した複合体を形成できなかった。最近、ジスルフィド結合で架橋されたホモ二量体の MIC19 が高親和性で MIC60 と結合することが報告されたため、精製中にランダムに酸化された MIC19 を再還元し二量体として精製したサンプルを用いた構造解析を進めている。



細胞内cAMPはMIC60/19のリン酸化を介してPINK1安定化とParkin標的化を制御する(上図)。LETM1 は人工リポソームに膜陥入構造を形成できる

(3) 哺乳動物 MICOS 複合体の機能解析 (岡グループ)

[実施方法・実施内容・成果] クリステジャンクション形成を担う MICOS 複合体は酵母からヒトまで保存されているが、そのコアサブユニットである MIC60 と MIC19 には、脊椎動物のみに保存される PKA リン酸化部位(MIC60, Ser528; MIC19, Thr11)が存在する。MIC60/19 組換えタンパク質と PKA を用いた *in vitro* リン酸化反応およびリン酸化特異的抗体により、細胞内での PKA による MIC60/19 のリン酸化を確認した。MIC60 の擬似リン酸化変異体や非リン酸化変異体では Clear-Native PAGE での MICOS 複合体の複合体形成が変化していたことから、リン酸化による MICOS 複合体の機能制御が推定された。また、架橋剤を用いた共免疫沈降により、MIC60 とミトコンドリア品質管理に関かわる PINK1 との相互作用が見出された。そこで、アデニル酸シクラーゼのアゴニストである forskolin 処理により細胞内 cAMP 濃度を上昇させて PKA 活性化を促したところ、PINK1 量の顕著な減少とユビキチンリガーゼ Parkin の不良ミトコンドリアへの移行阻害が見出された。さらに、siRNA を用いた MIC60 発現抑制細胞に MIC60 の擬似リン酸化変異体や非リン酸化変異体を導入した結果、MIC60 非リン酸化変異体のみで Parkin の不良ミトコンドリアへの標的化が回復し、PKA による MIC60 リン酸化が PINK1/Parkin (菌類には存在しない)を介したミトコンドリア品質管理を負に制御していることが明らかになった。同様の結果は MIC19 のリン酸化変異体でも得られた。また、電子顕微鏡解析により MIC60 の非リン酸化変異体や擬似リン酸化変異体のみを発現する細胞では正常なクリステ構造を保持していたため、MIC60 のリン酸化修飾はクリステ構造形成ではなく、ミトコンドリア品質管理にのみ働くことが明らかとなった。

[(1) ~ (3) の成果の位置づけ及び類似研究との比較] 本研究は、セカンドメッセンジャーを介したミトコンドリア品質管理の制御機構の最初の例である。これまでの研究では、ミトコンドリア品質管理はミトコンドリア自身の膜電位低下のみにより引き起されると考えられてきたが、セカンドメッセンジャーである cAMP の濃度により品質管理が調節されるという発見は、同様に他のミトコンドリア外シグナルもミトコンドリアの品質管理を制御する可能性を示している。また、細胞内シグナルに目を向けることで若年性遺伝性パーキンソン病の症状改善を促す、異なる分子機序の新たな低分子化合物の探索が可能となると間が考えられる。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 31件)

1. T. Shiota, M. Maruyama, M. Miura, Y. Tamura, K. Yamano, M. Esaki, and T. Endo
The Tom40 assembly process probed using the attachment of different intra-mitochondrial sorting signals.
Mol. Biol. Cell 23, 3936-3947 (2012) doi: 10.1091/mbc.E12-03-0202
2. Y. Tamura, O. Onguka, K. Itoh, T. Endo, M. Iijima, S. M. Claypool, H. Sesaki
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(2012) doi: 10.1074/jbc.M112.390997
3. K. Okatsu, T. Oka, M. Iguchi, K. Imamura, H. Kosako, N. Tani, M. Kimura, E. Go, F. Koyano, M. Funayama, K. Shiba-Fukushima, S. Sato, H. Shimizu, Y. Fukunaga, H. Taniguchi, M. Komatsu, N. Hattori, K. Mihara, K. Tanaka, and N. Matsuda
PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria
Nature Commun. 3 Article Number 1016 (2012) (DOI: 10.1038/ncomms2016)
4. Y. Tamura, Y. Harada, S. Nishikawa, K. Yamano, M. Kamiya, T. Shiota, T. Kuroda, O. Kuge, H. Sesaki, K. Imai, K. Tomii, and T. Endo
Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase required for cardiolipin biosynthesis in mitochondria
Cell Metab. 17, 709-718 (2013) doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.018
5. T. Shiota, S. Nishikawa, and T. Endo
Analyses of protein-protein interactions by in vivo photocrosslinking in budding yeast
Meth. Mol. Biol. 1033, 207-217 (2013) doi: 10.1007/978-1-62703-487-6_14
6. K. Okatsu, M. Uno, F. Koyano, E. Go, M. Kimura, T. Oka, K. Tanaka and N. Matsuda
A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment.
J. Biol. Chem. 288, 36372-36384 (2013) (DOI:10.1074/jbc.M113.509653)
7. K. Onoue, A. Jofuku, R. Ban-Ishihara, T. Ishihara, M. Maeda, T. Koshiha, T. Itoh, M. Fukuda, H. Otera, T. Oka, H. Takano, N. Mizushima, K. Mihara, and N. Ishihara
Fis1 acts as mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that involved in regulation of mitochondrial morphology
J. Cell Sci. 126, 176-185 (2013) (DOI: 10.1242/jcs.111211)
8. B. Rahman, S. Kawano, K. Yunoki-Esaki, T. Anzai, and T. Endo
NMR analyses on the interactions of the yeast Tim50 C-terminal region with the presequence and Tim50 core domain
FEBS Lett. 588, 678-684 (2014) doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.037
9. D. Maruyama, T. Sugiyama, T. Endo, and S. Nishikawa
Multiple BiP genes of *Alabidopsis thaliana* are required for male gametogenesis and pollen competitiveness.
Plant Cell Physiol. 55, 801-810 (2014) doi: 10.1093/pcp/pcu018
10. H. Okamoto, A. Miyagawa, T. Shiota, Y. Tamura and T. Endo
Intra-molecular disulfide bond of Tim22 maintains integrity of the TIM22 complex in the

mitochondrial inner membrane

J. Biol. Chem. 289, 4827-4838 (2014) doi: 10.1074/jbc.M113.543264.

11. J. Song, Y. Tamura, T. Yoshihisa, and T. Endo

A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex

EMBO Rep. 15, 670-677 (2014) doi: 10.1002/embr.201338142

12. F. Koyano, K. Okatsu, H. Kosako, Y. Tamura, E. Go, M. Kimura, Y. Kimura, H. Tsuchiya, H. Yoshihara, T. Hirokawa, T. Endo, E. A. Fon, J. F. Trempe, Y. Saeki, K. Tanaka, and N. Matsuda

Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin.

Nature 510, 162-166 (2014) doi: 10.1038/nature13392

13. D. Maruyama, M. Yamamoto, T. Endo, and S. Nishikawa

Different sets of ER-resident J-proteins regulate distinct polar nuclear-membrane fusion events in *Arabidopsis thaliana*

Plant Cell. Physiol. 55, 1937-1944 (2-14)

14. A. Takano, T. Kajita, M. Mochizuki, T. Endo, and T. Yoshihisa

Cytosolic Hsp70 and co-chaperones constitute a novel system for tRNA import into the nucleus.

eLife 4, e04659 (2015) doi: 10.7554/eLife.04659

15. D. Maruyama, T. Endo, and S. Nishikawa

BiP3 supports the early stages of female gametogenesis in the absence of BiP1 and BiP2 in *Arabidopsis thaliana*

Plant Signal Behav. 10, e1035853 (2015) doi: 10.1093/pcp/pcu120

16. K. Okatsu, M. Kimura, T. Oka, K. Tanaka and N. Matsuda.

Unconventional PINK1 localization to the outer membrane of depolarized mitochondria drives Parkin recruitment.

J. Cell Sci. 128, 964-978 (2015) (DOI: 10.1242/jcs.161000)

17. Y. Watanabe, Y. Tamura, S. Kawano, and T. Endo

Structural and mechanistic insights into phospholipid transfer by Ups1-Mdm35 in mitochondria

Nature Commun. 6, Article number: 7922 (2015) doi: 10.1038/ncomms8922

18. T. Shiota, K. Imai, J. Qiu, V. L. Hewitt, K. Tan, H.-H. Shen, N. Sakiyama, Y. Fukasawa, S. Hayat, M. Kamiya, A. Elofsson, K. Tomii, P. Horton, N. Wiedemann, N. Pfanner, T. Lithgow, and T. Endo

Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate

Science, 349, 1544-1548 (2015) doi: 10.1126/science.aac6428

19. M. Kohei, R. Kojima, T. Obita, Y. Ohkuma, Y. Tamura, and M. Mizuguchi.

Crystal structure of human general transcription factor TFIIE at atomic resolution

J. Mol. Biol. 428, 4258-4266 (2016)

20. S. Akabane, K. Matsuzaki, S.I. Yamashita, K. Arai, K. Okatsu, T. Kanki, N. Matsuda, and T. Oka

Constitutive activation of PINK1 protein leads to proteasome-mediated and non-apoptotic cell death independently of mitochondrial autophagy.

J. Biol. Chem. 291, 16162-16174. (2016) DOI: 10.1074/jbc.M116.714923

21. S. Akabane, M. Uno, N. Tani, S. Shimazaki, N. Ebara, H. Kato, H. Kosako, and T. Oka
PKA regulates PINK1 stability and Parkin recruitment to damaged mitochondria through phosphorylation of MIC60.

Mol. Cell 62, 371-384. (2016) DOI: 10.1016/j.molcel.2016.03.037

22. 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)

23. T. Jores, A. Klinger, L. E. Groß, S. Kawano, N. Flinner, E. Duchardt-Ferner, J. Wöhnert, 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)

24. 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)

25. S. 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)

26. 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)

27. Suzuki T, Iida N, Suzuki J, Watanabe Y, Endo T, Hisabori T, Yoshida M.

Expression of mammalian mitochondrial F1-ATPase in *Escherichia coli* depends on two chaperone factors, AF1 and AF2.

FEBS Open Bio. 2016 Oct 25;6(12):1267-1272 (2016)

28. Ban, T., Ishihara, T., Kohno, H., Saita, S., Ichimura, A., Maenaka, K., Oka, T., Mihara, K. and Ishihara

N. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin.

Nat. Cell Biol. 19, 856-863. (2017) DOI: 10.1038/ncb356

29. Kawano, S. Tamura, Y. Kojima, R. Bala, S. Asai, Michel, EA. Kornmann, B. Riezman, I. Riezman, H. Sakae, Y. Okamoto, Y. and Endo T.

Structure–function insights into direct lipid transfer between membranes by Mmm1–Mdm12 of ERMES.

J. Cell. Biol. 217, 959–974 (2018). DOI: 10.1083/jcb.201704119.

30. Matsumura, A., Higuchi, J., Watanabe, Y., Kato, M., Aoki, K., Akabane, S., Endo, T. and Oka, T.

Inactivation of cardiolipin synthase triggers changes in mitochondrial morphology.

FEBS Lett. 592), 209-218. (2018) DOI: 10.1002/1873-3468.12948

31. Kakimoto, Y., Tashiro, S., Kojima, R., Morozumi, M., Endo, T., and Tamura. Y.

Visualizing multiple inter-organelle contact sites using the organelle-targeted split-GFP system

Sci. Rep. 8, Article number: 6175. (2018) DOI:10.1038/s41598-018-24466-0

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Y. Tamura and T. Endo

Unveiling the last missing link of the cardiolipin synthetic pathway in mitochondria
(Editorial)

Aging 6, 392-393 (2013)

2. N. Ishihara, H. Otera, T. Oka, and K. Mihara

Regulation and physiologic functions of GTPases in mitochondrial fusion and fission in mammals

Antioxid. Redox Signal 19, 389-399 (2013)

3. Y. Tamura, H. Sesaki and T. Endo

Phospholipid transport via mitochondria.

Traffic 15, 933-945 (2014) doi: 10.1111/tra.12188

4. 岡 敏彦

ミトコンドリア形態異常と疾患

医学のあゆみ 254, 447-451 (2015)

5. 赤羽しおり, 岡 敏彦

(カレントトピックス)PKA は MIC60 のリン酸化を介して PINK1 と Parkin によるミトコンドリア品質管理を制御する

実験医学, 34, 2689-2692 (2016)

6. 塩田拓也, 今井賢一郎, 遠藤斗志也

(カレントトピックス) 部位特異的光架橋で明らかになったインテリジェントなミトコンドリアタンパク質膜透過機構

実験医学 34, 591-595 (2016)

7. 遠藤斗志也

ミトコンドリア蛋白質の配送機構

(週刊)医学のあゆみ 260, 37-41 (2017)

8. Y. Tamura and T. Endo

Role of intra- and inter-mitochondrial membrane contact sites in yeast phospholipid biogenesis in "Organelle Contact Sites: From Molecular Mechanism to Disease, *Advances in Experimental Medicine and Biology*" (eds Mitsuo Tagaya, Thomas Simmen), Springer (2017).

DOI: 10.1007/978-981-10-4567-7

9. Endo T. and Tamura Y.

News and Views; Shuttle mission in the mitochondrial intermembrane space.

EMBO J. e98993 (2018). DOI 10.15252/embj.201898993

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 30 件、国際会議 19 件)

Toshiya Endo (名古屋大学)
New perspective on biogenesis of mitochondrial proteins and lipids
第 85 回日本生化学会大会シンポジウム「New Paradigm of Organelle Biology and Physiology」2012.12.14-16 博多

田村康, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ミトコンドリアを介したリン脂質生合成経路の解析
第 85 回日本生化学会大会シンポジウム「ミトコンドリアの動的な構造・機能変換とその生理機能」2012.12.14-16 福岡.

Toshiya Endo (名古屋大学)
New insight into mitochondrial biogenesis
Organelle Homeostasis Research Center: Kick-off Symposium, 2013.3.22 福岡

Toshiya Endo (名古屋大学)
Organelle homeostasis research in Japan
Organelle Homeostasis Research Center: Workshop on Homeostasis Research 2013.3.23 福岡

*Toshiya Endo (名古屋大学)
New perspective on biogenesis of mitochondrial proteins and lipids
EMBO Conference: From Structure to Function of Translocation Machines 2013.4.13-17 Dubrovnik, Croatia

田村康, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ミトコンドリア型 CDP-DAG 合成酵素の発見
第 65 回日本細胞生物学会 シンポジウム「Proteostasis」
2013.6.19~21, 名古屋.

*Toshiya Endo (名古屋大学)
Transport, assembly, and quality control of mitochondrial proteins in yeast (**Pleenary Lecture**)
Yeast 2013 (The 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology)
2013.8.29-9.3 Frankfurt, Germany

*Toshihiko Oka (立教大学)
Formation of Cristae Structure in Mammals
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria - from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease, 2013.10.28-11.1 Okinawa Japan

*Toshiya Endo (名古屋大学)
How the cell makes mitochondria: from the viewpoints of transport of proteins and lipids
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria - from Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease 2013.10.28-11.1 Okinawa, Japan

遠藤斗志也 (名古屋大学)
タンパク質と脂質の輸送と合成からみた酵母ミトコンドリアの生合成機構
第 185 回酵母細胞研究会例会 2013.11.22 東京

Toshiya Endo (京都産業大学)
How the cell makes mitochondria from proteins and lipids
Mini-symposium at National Taiwan University 2014.5.16 Taipei

Toshiya Endo (京都産業大学)
How the cell makes mitochondria from proteins and lipids
The KSU International Symposium: Cutting-edge of Life Sciences 2014.5.30-31 Kyoto

田村康¹, 遠藤斗志也² (¹名古屋大学, ²京都産業大学総合生命科学部)
試験管内リン脂質輸送反応アッセイ系の開発
第66回日本細胞生物学会 2014.6.11-13 奈良

遠藤斗志也 (京都産業大学)
酵母ミトコンドリアにおけるタンパク質と脂質の輸送機構
第52回生物物理学会年会シンポジウム「膜動態から探るミトコンドリア・ネオバイオロジー」2014.9.25-27 札幌

田村康¹, 遠藤斗志也² (¹名古屋大学, ²京都産業大学)
Phospholipid trafficking between mitochondria and the endoplasmic reticulum
第87回日本生化学会 2014.10.15~18 京都

岡 敏彦 (立教大学)
ミトコンドリア形態とクリステ構造の形成機構
第25回フォーラム・イン・ドージン 2014.11.14 熊本

Toshiya Endo (京都産業大学)
Croslinking approaches in membrane biology
TAMPTing Seminar 3 2015.3.16-18 Amsterdam, The Netherlands

Yasushi Tamura¹, Yasunori Watanabe², Shin Kawano², and Toshiya Endo² (¹名古屋大学, ²京都産業大学)
Structural and mechanistic insight into phospholipid transfer via mitochondria
Progress 100: Kyushu-U and Stanford-U Joint Research and Education Program First Symposium: From Genes to Human Diseases 2015.3.16-17 福岡

*Toshiya Endo (京都産業大学)
Machineries for transport of proteins and lipids for mitochondrial biogenesis
EMBO Conference on Mechanisms and regulation of protein translocation 2015.3.21-25
Dubrovnik, Croatia

田村康 (山形大学)
ミトコンドリアの機能に必須のリン脂質輸送タンパク質
第57回脂質生化学会 2015.5.28-29 東京

遠藤斗志也 (京都産業大学)
ミトコンドリア生合成に関わる分子装置の構造と機能
第15回日本蛋白質科学会年会 シンポジウム「細胞内の蛋白質の一生：新生から死に至るまで」2015.6.24-26 徳島

河野慎¹, 渡邊康紀¹, 田村康², 遠藤斗志也¹ (¹京都産業大学, ²山形大学)
膜間リン脂質輸送の構造生物学
第67回日本細胞生物学会年会 シンポジウム「ミトコンドリアが魅せる新境地-拡大を続けるミトコンドリアワールド」2015.6.30-7.2 東京

岡 敏彦 (立教大学)
PINK1の活性化とカスパーゼ非依存性の細胞死
BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4 神戸

遠藤斗志也 (京都産業大学)
ミトコンドリア合成のためのタンパク質と脂質の交通
BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会) シンポジウム「オルガネラバイオロジー: 細胞の構造と機能の新しい姿」 2015.12.1-4 神戸

*Toshiya Endo (京都産業大学)
Protein import into mitochondria and the ER
Gordon Research Conference: Protein transport across cell membranes 2016.3.6-11 Galveston, Texas

田村康 (山形大学)
ミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送機構の解明
2015年度 遺伝研研究会「単細胞の細胞構築・運動・増殖機構の研究」 2016.3.25 三島

Yasushi Tamura (山形大学)
Nonvesicular Phospholipid transport via mitochondria
The 21st International Symposium on Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Emerging Science for Unlocking Cell's Secrets 2016.6.3 京都

塩田拓也¹, 今井賢一郎², 深沢嘉紀², 富井健太郎², Paul Horton², 遠藤斗志也³ (¹モナシユ大学, ²産総研, ³京都産業大学)
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 2016.6.7-9 博多

*Toshiya Endo (京都産業大学)
Transport of Proteins and Lipids to Mitochondria
Gordon Research Conference on Mitochondria and Chloroplasts 2016.6.19-24 Mount Snow, USA

*Toshiya Endo (京都産業大学)
Machineries for mitochondrial protein and lipid transport
FASEB Science Research Conference: Molecular Biophysics of Membranes 2016.7.10-15 Snowmass, Colorado, USA

Toshiya Endo (京都産業大学)
Quality control of nonstop proteins at the organelle membranes (Invited talk)
Nascent Chain Biology Meeting 2016.9.1-3 山梨県富士河口湖町

Toshiya Endo (京都産業大学)
Mitochondrial biogenesis through protein and lipid transport (**plenary lecture**)
ICES 2016 Kyoto (The 13th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis) 2016.9.10-14 京都

田村康 (山形大学)
試験管内再構成実験系を利用したミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送機構の解析,
第89回日本生化学会 2016.9.25-27 仙台

遠藤斗志也 (京都産業大学)
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
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」 2016.11.25-27 つくば

赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, 岡 敏彦 (立教大学)

PINK1 stability and Parkin mitochondrial targeting are regulated by PKA-mediated phosphorylation of MIC60
第 39 回日本分子生物学会年会 2016.11.30-12.2 横浜

Toshiya Endo (京都産業大学)

Protein and lipid transport for mitochondrial biogenesis

第 39 回分子生物学会年会シンポジウム「タンパク質・脂質輸送が解き明かすオルガネラ動態」 2016.11.30-12.2 横浜

塩田拓也¹, 今井賢一郎², Paul Horton², 遠藤斗志也³, Trevor Lithgow¹ (¹モナシユ大学, ²産総研, ³京都産業大学)

ミトコンドリアタンパク質搬入口の形と機能

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」
2016.11.30-12.2 横浜

田村 康¹, 小島 理恵子¹, 遠藤 斗志也² (¹山形大学, ²京都産業大学)

リン脂質輸送における ERMES 複合体の役割

第 39 回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」 2016.11.30-12.2 横浜

岡 敏彦 (立教大学)

PKA による MIC60 リン酸化を介したミトコンドリア品質管理の制御機構

第 90 回日本薬理学会年会, 2017.3.15-17 長崎

岡 敏彦 (立教大学)

ミトコンドリア品質管理の cAMP/PKA による制御機構

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」 2017.3.21-22
吹田市, 大阪

遠藤斗志也 (京都産業大学)

新たな視点で考えるミトコンドリア生合成の仕組み

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」 2017.3.21-22
吹田市, 大阪

Toshiya Endo (京都産業大学)

Biogenesis and maintenance of mitochondria through protein and lipid transport

42nd FEBS Congress 2017.9.10-14 Jerusalem, Israel

田村 康 (山形大学)

Structural and Mechanistic Insights into Phospholipid Transfer via Mitochondria

Smasys 2017 (5th International Conference on Smart Systems Engineering 2017) 2017.10.5,
山形大学米沢キャンパス

遠藤斗志也 (京都産業大学)

奇跡の分子, タンパク質が拓く細胞の不思議な世界 (特別講演)

名古屋市立大学総合生命理学部新設記念シンポジウム「未来を拓くサイエンス」
2017.10-15 名古屋市立大学

田村 康 (山形大学)

出芽酵母における ミトコンドリア・小胞体連携ゾーンの役割

ConBio2017 1AW18 細胞機能を司るオルガネラ・ゾーンの解説 2017.12.6 神戸国際会議場

遠藤斗志也 (京都産業大学)

タンパク質と脂質からミトコンドリアをつくる

ConBio2017 (第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会) シンポジウム「拡大する蛋白質科学のフロンティア」 2017.12.6-9 神戸ポートアイランド

Toshiya Endo (京都産業大学)

Mitochondrial Protein and Lipid Transport (Invited)

Gordon Research Conference on Protein Transport across Cell Membranes 2018.3.11-16 Galveston, TX, USA

田村 康 (山形大学)

オルガネラ間リン脂質輸送反応の再構成実験系

大阪大学蛋白質研究所セミナー・再構成アプローチが開拓する生体膜・膜タンパク質研究の最前線 2018.3.27 大阪大学蛋白質研究所

② 口頭発表 (国内会議 24 件、国際会議 0 件)

岡 敏彦 (立教大学)

ミトコンドリア形態とクリステ膜構造の形成機構

第85回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡

安西高廣, 河野慎, 寺尾佳代子, 遠藤斗志也 (名古屋大学)

ミトコンドリア前駆体タンパク質の酸化における, Tim40/Mia40 と Erv1 の構造基盤の解明 (口頭発表+ポスター発表)

第85回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡

河野慎, スチンバラ, 遠藤斗志也 (名古屋大学)

ERMES 複合体構成タンパク質 Mdm12 の構造解析 (口頭+ポスター)

第86回日本生化学会大会 2013.9.11-13 横浜

Jiyao Song¹, Tohru Yoshihisa², Yasushi Tamura¹, and Toshiya Endo¹ (¹名古屋大学, ²兵庫県立大学)

Novel pathway for import of yeast OM45 into the mitochondrial intermembrane space (口頭+ポスター)

第86回日本生化学会大会 2013.9.11-13 横浜

安西高廣, 河野慎, 遠藤斗志也 (名古屋大学)

NMRによるミトコンドリア酸化還元トランスロケータ Tim40 の基質認識機構の解析 2013年度生物物理学会中部支部会 2014.3.6 岡崎

岡 敏彦 (立教大学)

オルガネラ形態の機能的意義

第1回生命分子科学研究会 2014.3.17-19, 北海道

Jiao Song¹, Yasushi Tamura¹, Tohru Yoshihisa², Toshiya Endo³ (¹名古屋大学, ²兵庫県立大学, ³京都産業大学)

A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex

- 第 66 回細胞生物学会大会 (口頭発表) 2014.6.11-13 奈良
- 小島理恵子¹, 梶原秀¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (1 名古屋大学, 2 京都産業大学)
ミトコンドリアと小胞体を結合させる ERMES 複合体欠損株のマルチコピーサプレッサー解析
- 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都
- Jiyao Song¹, Yasushi Tamura¹, Tohru Yoshihisa², and Toshiya Endo³ (1 名古屋大学, 2 兵庫県立大学, 3 京都産業大学)
A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex
- 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都
- 松本俊介¹, 嶋田睦¹, 遠藤斗志也², 神田大輔¹ (1 九州大学, 2 京都産業大学)
古細菌由来オリゴ糖転移酵素の基質ペプチド複合体の結晶構造 (口頭発表+ポスター)
- 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都
- 河野慎, 浅井絵里, スチンバラ, 遠藤斗志也 (1 名古屋大学, 2 京都産業大学)
ERMES 複合体構成因子 Mdm12 および Mmm1 によるリン脂質輸送メカニズムの解明 (口頭発表+ポスター)
- 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都
- 宇野碧, 岡 敏彦 (立教大学)
Parkin のミトコンドリア外膜標的化に関わる MICOS 複合体の解析
- 第 14 回日本ミトコンドリア学会 2014.12.3, 福岡
- 松崎航平¹, 荒井伽奈¹, 尾勝圭², 松田憲之², 岡 敏彦¹ (1 立教大学, 2 東京都医学総合研究所)
PINK1/Parkin によるカスパーゼ非依存性細胞死の解析
- 第 14 回日本ミトコンドリア学会 2014.12.3, 福岡
- 赤羽しおり, 宇野碧, 島崎俊太, 岡 敏彦 (立教大学)
MICOS 複合体による PINK1 のミトコンドリア標的化の制御機構
- 第 67 回日本細胞生物学会 2015.6.30-7.2, 東京
- 田村康¹, 遠藤斗志也² (1 山形大学, 2 京都産業大学)
ミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送反応の再構成実験系の確立
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸
- 両角勇紀¹, 久田萌子¹, 遠藤斗志也², 田村康³ (1 名古屋大学, 2 京都産業大学, 3 山形大学)
出芽酵母を用いたミトコンドリア-液胞間新規テザリング因子の遺伝学的探索
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸
- 渡邊康紀¹, 田村康², 河野慎¹, 遠藤斗志也¹ (1 京都産業大学, 2 山形大学)
Ups1-Mdm35 複合体の結晶構造から明らかになったミトコンドリア膜間のリン脂質輸送機構
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸
- Jiyao Song¹, Yasushi Tamura², Tohru Yoshihisa³, Toshiya Endo⁴ (1 名古屋大学, 2 山形大学, 3 兵庫県立大学, 4 京都産業大学), Analysis of outer membrane insertion mechanism of yeast

mitochondrial protein, BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会), 神戸, 2015.12.1-4.

小島理恵子¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (1 山形大学, 2 京都産業大学)
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, 2016.9.25-9.27.

植田依里¹, 田村康², 遠藤斗志也³ (1 名古屋大学, 2 山形大学, 3 京都産業大学)
ミトコンドリアクリステジャンクション形成に関する Mic19 の輸送機構の解析
第 89 回日本生化学会, 仙台, 2016.9.25-9.27.

柿本百合子¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (1 山形大学, 2 京都産業大学)
3P-0287 (4P2T19-02) : Split-GFP を用いたオルガネラ膜間テザリング因子の探索
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.8, 9, 神戸ポートアイランド

沢里 克宏¹, 佐藤 諒¹, 西川 華子¹, 飯村 直樹¹, 藤川 鋳樹², 山口 敏幸², 車 ゆうてつ³, 田村 康⁴, 遠藤 斗志也⁵, 上田 卓也⁶, 島本 啓子², 西山 賢一¹ (1 岩手大学, 2 サントリー生有研, 3 東京工業大学, 4 山形大学, 5 京都産業大学, 6 東京大学)
3P-1421 (4AT26-09) : タンパク質膜挿入反応に関する糖脂質酵素 MPLase は生育に必須である
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.8, 神戸ポートアイランド

荒磯 裕平¹, 包 明久², Andr Heuer³, Roland Beckmann³, 吉川 雅英², 遠藤 斗志也¹ (1 京都産業大学, 2 東京大学, 3 ミュンヘン大学, 4 京都産業大学)
ミトコンドリア膜透過中に翻訳停止したリボソーム・新生鎖複合体の構造・機能研究 (ポスター発表, 口頭発表)
ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会) 2017.12.6-9 神戸ポートアイランド

鈴木 俊治^{1,2,3}, 平田 邦生⁴, 山下 栄樹⁵, 飯田 直也⁶, 遠藤 斗志也³, 久堀 徹², 吉田 賢右³, 野地 博行¹ (1 東京大学, 2 東京工業大学, 3 京都産業大学, 4 理化学研究所, 5 大阪大学, 6 早稲田大学)
1 分子モーターが動いている瞬間を見る: 時分割動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1 の回転力発生機構の分析 (ポスター発表, 口頭発表)
ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会) 2017.12.6-9 神戸ポートアイランド

③ ポスター発表 (国内会議 51 件、国際会議 9 件)

河野慎, スチンバラ, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ERMES 複合体構成因子 Mdm12 の結晶化 (ポスター発表)
第 85 回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡

荒川俊輔¹, 井澤俊明¹, 遠藤斗志也¹, 西川周一² (1 名古屋大学, 2 新潟大学)
シロイヌナズナ CPY*を用いた異常タンパク質の小胞体残留機構の解析 (ポスター発表)

表)

第 85 回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡

前川健, 田村康, 吉久徹, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ERMES の形成過程および数の制御の解析 (ポスター発表)
第 85 回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡

岡本浩明, 宮川明子, 塩田拓也, 田村康, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ミトコンドリアタンパク質輸送装置 Tim22 の分子内ジスルフィド結合の役割の解析
(ポスター発表)
第 85 回日本生化学会大会 2012.12.14-16 福岡

Jiyao Song, Tohru Yoshihisa, Yasushi Tamura, and Toshiya Endo (名古屋大学)
OM45 is imported into the mitochondrial intermembrane space via a novel import pathway
(ポスター発表)
第 77 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 2013.5.25 名古屋

植田依里, 田村康, 河野慎, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
出芽酵母におけるミトコンドリアクリステジャンクション形成因子の輸送経路 (ポ
スター発表)
第 77 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 2013.5.25 名古屋

河野慎, スチンバラ, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ERMES 複合体 Mdm12 の構造解析
第 13 回日本蛋白質科学会年会 2013.6.12-14 鳥取

Jiyao Song¹, Tohru Yoshihisa², Yasushi Tamura¹, Toshiya Endo¹ (¹名古屋大学, ²兵庫県
立大学)
OM45 is imported into the mitochondrial intermembrane space via a novel import pathway
(ポスター発表)
第 65 回細胞生物学会大会 2013.6.19-21 名古屋

荒川俊輔¹, 井澤俊明¹, 西川周一², 田村康¹, 遠藤斗志也¹ (¹名古屋大学, ²新潟
大学)
ノンストップ膜タンパク質の品質管理機構の解析 (ポスター)
第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13 横浜

田村康, 谷口真由美, 神谷恵, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ミトコンドリアにおけるリン脂質合成経路 (ポスター)
第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13 横浜

江崎芳, Bytul Rahman, 石丸雄基, 河野慎, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
ミトコンドリア膜間部におけるタンパク質輸送機構の解明 (ポスター)
第 86 回日本生化学会大会 2013.9.11-13 横浜

Aiko Matsui, Azumi Hatano, Seiko Nakamura, Astumi Toyoda, Yuriko Miyano, Toshihiko
Oka (立教大学)
A direct role of LETM1 protein in the formation of cristae structure
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria – from
Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease, 2013.10.28-11.1, Okinawa,
Japan

Kaori Esaki, Bytul Rahman, Yuki Ishimaru, Shin Kawano, and Toshiya Endo (名古屋大学)
Analysis of two presequence binding domains of Tim50 (poster)
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria – from

Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease 2013.10.28-11.1
Okinawa, Japan

Jiyao Song¹, Tohry Yoshihisa², Yasushi Tamura¹, and Toshiya Endo¹ (¹名古屋大学, ²兵庫県立大学)

Novel pathway for import of yeast OM45 into the mitochondrial intermembrane space (poster)
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria – from
Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease 2013.10.28-11.1
Okinawa, Japan

Yasushi Tamura¹, Yoshihiro Harada¹, Shuh-ichi Nishikawa², Koji Yamano¹, Megumi Kamiya¹,
Takuya Shiota³, Takuya Kuroda⁴, Osamu Kuge⁴, Hiromi Sesaki⁵, Kenichiro Imai⁶, Kentaro
Tomii⁶, and Toshiya Endo¹ (¹名古屋大学, ²新潟大学, ³モナシユ大学, ⁴九州大学, ⁵Johns
Hopkins Univ., ⁶産総研)

Tam41 is a CDP-diacylglycerol synthase for cardiolipin biosynthesis in mitochondria (poster)
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria – from
Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease 2013.10.28-11.1 Okinawa,
Japan

Shin Kawano, Si-quinbala, Eri Asai, and Toshiya Endo (名古屋大学)

Structural analysis of Mdm12 (poster)
DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria – from
Molecular Mechanisms to Physiological Functions and Disease 2013.10.28-11.1
Okinawa, Japan

田村康・谷口真由美・神谷恵・遠藤斗志也 (名古屋大学)
ミトコンドリアリン脂質組成維持に関わる因子の機能解析
第 36 回分子生物学会年会 2013.12.3-5 神戸

Bytul M. Rahman, Shin Kawano, Kaori Esaki, Takahiro Anzai, and Toshiya Endo (名古屋大学)

NMR investigations of presequence recognition by the C-terminal region of yeast Tim50 and
their interactive relationship with Tim50core domain
第 36 回分子生物学会年会 2013.12.3-5 神戸

植田依里, 田村康, 遠藤斗志也 (名古屋大学)
出芽酵母におけるミトコンドリアクリステジャンクション形成因子 Mcs タンパク質
の輸送経路
第 36 回分子生物学会年会 2013.12.3-5 神戸

小島理恵子, 梶浦秀, 遠藤斗志也, 田村康 (¹名古屋大学, ²京都産業大学)
ERMES 構成因子欠損株のマルチコピーサプレッサーの解析
第 66 回細胞生物学会大会 (ポスター発表) 2014.6.11-13 奈良

渡邊康紀¹, 河野慎¹, 田村康², 遠藤斗志也¹ (¹京都産業大学, ²名古屋大学)
ミトコンドリア膜間部におけるリン脂質輸送タンパク質 Ups1-Mdm35 複合体の構造
機能解析
(ポスター)
第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都

植田依里¹, 田村康¹, 遠藤斗志也² (¹名古屋大学, ²京都産業大学)
出芽酵母におけるミトコンドリアクリステジャンクション形成因子の輸送経路の解
析
(ポスター)
第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都

江崎芳¹, バイチュルラーマン², 石丸雄基², 河野慎¹, 遠藤斗志也¹ (¹ 京都産業大学, ² 名古屋大学)

2つの機能ドメインに注目したミトコンドリア内膜透過装置構成因子 Tim50 による
プレ配列認識機構の解析 (ポスター)

第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都

小島理恵子¹, 梶原秀¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (¹ 名古屋大学, ² 京都産業大学)

ミトコンドリアと小胞体を結合させる ERMES 複合体欠損株のマルチコピーサプレ
ッサー解析

第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都

Jiyao Song¹, Yasushi Tamura¹, Tohru Yoshihisa², and Toshiya Endo³ (¹ 名古屋大学, ¹ 兵庫
県立大学, ³ 京都産業大学)

A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the
TIM23 complex

第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 京都

田村康¹, 遠藤斗志也² (¹ 山形大学, ² 京都産業大学)

ミトコンドリア・小胞体間リン脂質輸送反応の再構成実験系の確立

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸

両角勇紀¹, 久田萌子¹, 遠藤斗志也², 田村康³ (¹ 名古屋大学, ² 京都産業大学, ³
山形大学)

出芽酵母を用いたミトコンドリア-液胞間新規テザリング因子の遺伝学的探索

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸

鈴木万葵¹, 小島理恵子¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (¹ 山形大学, ² 京都産業大学)

ミトコンドリア低分子キャリアータンパク質 Hem25 の機能解析

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸

古田詩唯奈¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (¹ 山形大学, ² 京都産業大学)

出芽酵母を用いたミトコンドリア-液胞間新規テザリング因子の遺伝学的探索

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸

小島理恵子¹, 梶浦秀², 遠藤斗志也³, 田村康¹ (¹ 山形大学, ² 名古屋大学, ³ 京都
産業大学)

ERMES 複合体の機能に関連する新規遺伝子の同定

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸

石坂直也¹, 塩田拓也², 田村康³, 遠藤斗志也⁴ (¹ 名古屋大学, ² モナシユ大学, ³
山形大学, ⁴ 京都産業大学)

Tom22 のミトコンドリア局在化における Por1 の役割の解明

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸

植田依里¹, 田村康², 遠藤斗志也³ (¹ 名古屋大学, ² 山形大学, ³ 京都産業大学)

ミトコンドリアクリステジャンクション形成に関与する Mic19 の輸送機構の解析

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)
2015.12.1-4, 神戸

沢里克宏¹, Michael Moser¹, 佐藤諒¹, 田村康², 遠藤斗志也³, 西山賢一¹ (1岩手大学, 2山形大学, 3京都産業大学)

タンパク質膜挿入・膜透過に関与する糖脂質酵素 MPIase の in vivo における機能解析 (ポスター)

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015.12.1-4 神戸

柚木-江崎芳¹, ラーマンバイチュル², 石丸雄基², 河野慎¹, 遠藤斗志也¹ (1京都産業大学, 2名古屋大学,)

ミトコンドリア内膜透過装置構成因子 Tim50 の相互作用解析 (ポスター)

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) 2015.12.1-4 神戸

Jiyao Song¹, Yasushi Tamura¹, Tohru Yoshihisa², and Toshiya Endo³ (1名古屋大学, 1兵庫県立大学, 3京都産業大学)

A novel import route for an N-anchor mitochondrial outer membrane protein aided by the TIM23 complex.

ASCB annual meeting. 2015.12.12-16, San Diego, USA.

Akabane, S, Uno, M., Shimazaki, S., Oka, T. (立教大)

MIC60 regulates PINK1 activation and Parkin recruitment through cAMP/PKA signaling pathway., Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Mitochondrial Dynamics", Sheraton Steamboat Resort, Steamboat Springs, CO, USA, 2016. 4.3-7.

松本 俊介¹, 田村 康², 江崎 雅俊³, 遠藤 斗志也¹ (1京都産業大学, 2山形大学, 3熊本大学)

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 (ポスター)

第 16 回日本蛋白質科学会年会 2016.6.7-9 福岡国際会議場 福岡

荒磯 裕平¹, 柚木 芳¹, 河野 慎¹, 鈴木 純子¹, 包 明久², 吉川 雅英², 遠藤 斗志也¹ (1京都産業大学, 2東京大学)

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 TOM40 複合体の大量調製

第 16 回日本蛋白質科学会年会 2016.6.7-9 福岡国際会議場 福岡

柚木芳¹, 荒川俊輔², 井澤俊明², 西川周一³, 田村康⁴, 遠藤 斗志也¹ (1京都産業大学, 2名古屋大学, 3新潟大学, 4山形大学)

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 (ポスター)

第 68 回細胞生物学会大会 2016.6.15-17 京都テルサ, 京都

松本 俊介¹, 田村 康², 江崎 雅俊³, 遠藤 斗志也¹ (1京都産業大学, 2山形大学, 3熊本大学)

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 (ポスター) 第 68 回細胞生物学会大会 2016.6.15-17 京都テルサ, 京都

古田詩唯奈¹, 小島理恵子¹, 田村康¹, 遠藤斗志也² (1山形大学, 2京都産業大学)

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 2016.9.25-9.27 仙台

渡邊康紀¹, 田村康², 遠藤斗志也¹ (²京都産業大学, ¹山形大学)
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 (ポスター発表) 第 39 回分子生物学会年会 2016.11.30-12.2 横浜

松本俊介¹, 江崎雅俊², 田村康³, 遠藤斗志也¹ (¹京都産業大学, ²熊本大学, ³山形大学)
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 (ポスター発表)
第 39 回分子生物学会年会 2016.11.30-12.2 横浜

Jiyao Song¹, Tohru Yoshihisa², Yasushi Tamura³ and Toshiya Endo¹ (¹名古屋大学, ²兵庫県立大学, ³山形大学, ⁴京都産業大学)
Analysis of the outer membrane insertion mechanism of yeast mitochondrial proteins (poster)
American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting 2016 2016.12.3-7 San Francisco, USA

Akabane, S., Uno, M., Shimazaki, S., Oka, T. (立教大学)
MIC60 regulates PINK1 activation and Parkin recruitment to damaged mitochondria through the cAMP/PKA signaling pathway
American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016, 2016.12.3-6 San Francisco, USA,

柿元百合子¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (¹山形大学, ²京都産業大学)
P2-049: Split GFP を用いたオルガネラ膜間近接評価実験系の確立 第 69 回日本細胞生物学会 2017.6.14, 仙台国際センター

鈴木俊治^{1,2,3}, 平田邦生⁴, 山下栄樹⁵, 遠藤斗志也³, 久堀徹², 吉田賢右³, 野地博行¹ (¹東京大学, ²東京工業大学, ³京都産業大学, ⁴理化学研究所, ⁵大阪大学)
角度分割・時分割 X 線結晶構造解析による, ほ乳類 F1-ATPase のリン酸解離駆動の回転発生機構の分析 (ポスター発表)
第 17 回日本蛋白質科学会年会 2017.6.20-22 仙台国際センター

渡邊康紀^{1,2}, 田村康³, 遠藤斗志也² (¹愛媛大学, ²京都産業大学, ³山形大学)
VAT-1 による ER-ミトコンドリア間のリン脂質輸送の構造基盤 (ポスター発表)
第 17 回日本蛋白質科学会年会 2017.6.20-22 仙台国際センター

阪上春香¹, 石坂直也¹, 塩田拓也², 田村康³, 遠藤斗志也¹ (¹京都産業大学, ²モナシュ大学, ³山形大学)
ミトコンドリア外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリーにおける Por1 の役割 (ポスター発表)
第 17 回日本蛋白質科学会年会 2017.6.20-22 仙台国際センター

鈴木 俊治^{1,2,3}, 平田 邦生⁴, 山下 栄樹⁵, 飯田 直也⁶, 遠藤 斗志也³, 久堀 徹², 吉田 賢右³, 野地 博行¹ (¹東京大学, ²東京工業大学, ³京都産業大学, ⁴理化学研究所, ⁵大阪大学, ⁶早稲田大学)
角度分割・時分割 X 線結晶構造解析による, 哺乳類 F1-ATPase のリン酸解離駆動の回転力発生機構の分析 (ポスター発表)
第 55 回生物物理学会年会 2017.9.19-21-22 熊本大学

松村綾香, 樋口 准, 青木啓悟, 岡 敏彦 (立教大学)
ミトコンドリア形態におけるカルジオリピンの役割 (ポスター発表)
生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6-9 神戸

松本俊介¹, 中務邦雄², 田村康³, 江崎雅俊⁴, 遠藤斗志也¹ (¹京都産業大学, ²名古屋市立大学, ³山形大学, ⁴熊本大学)
1P0187: ミトコンドリア外膜へのミスターゲットした膜タンパク質の分解機構の解析
2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6, 神戸ポートアイランド

小島理恵子¹, 伊藤喜重², 瀬崎博美², 遠藤斗志也³, 田村康¹ (¹山形大学, ²ジョンズホプキンス大学, ³京都産業大学)
1P-0332: カルジオリピン量の維持には正常なクリステ構造が必要である 2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6, 神戸ポートアイランド

古田詩唯奈¹, 小島理恵子¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (¹山形大学, ²京都産業大学)
1P-0335: 小胞体膜タンパク質 Ilm1 の欠損はリン脂質輸送とスフィンゴ脂質異常を引き起こす
2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.6, 神戸ポートアイランド

帯田孝之¹, 三輪康平¹, 小島理恵子², 大熊芳明¹, 田村康², 水口峰之¹ (¹富山大学, ²山形大学)
2P-0076: 基本転写因子 TFIIIE の構造生物学的研究
2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.7, 神戸ポートアイランド

阪上春香¹, 石坂直也¹, 塩田拓也², 田村康³, 遠藤斗志也¹ (¹京都産業大学, ²モナシュ大学, ³山形大学)
2P-0271: ミトコンドリアポリンタンパク質 Por1 は外膜透過装置 TOM 複合体のアセンブリー調節因子として機能する
2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.7, 神戸ポートアイランド

柿元百合子¹, 遠藤斗志也², 田村康¹ (¹山形大学, ²京都産業大学)
3P-0287 (4P2T19-02): Split-GFP を用いたオルガネラ膜間テザリング因子の探索
2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.8, 9, 神戸ポートアイランド

沢里 克宏¹, 佐藤 諒¹, 西川 華子¹, 飯村 直樹¹, 藤川 鉦樹², 山口 敏幸², 車 ゆうてつ³, 田村 康⁴, 遠藤 斗志也⁵, 上田 卓也⁶, 島本 啓子², 西山 賢一¹ (¹岩手大学, ²サントリー生有研, ³東京工業大学, ⁴山形大学, ⁵京都産業大学, ⁶東京大学)
3P-1421 (4AT26-09): タンパク質膜挿入反応に関与する糖脂質酵素 MPIase は生育に必須である
2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017.12.8, 神戸ポートアイランド

荒磯 裕平¹、包 明久²、Andr Heuer³、Roland Beckmann³、吉川 雅英²、遠藤 斗志也¹ (¹ 京都産業大学, ² 東京大学, ³ ミュンヘン大学, ⁴ 京都産業大学)

ミトコンドリア膜透過中に翻訳停止したリボソーム・新生鎖複合体の構造・機能研究 (ポスター発表, 口頭発表)

ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会) 2017.12.6-9
神戸ポートアイランド

鈴木 俊治^{1,2,3}、平田 邦生⁴、山下 栄樹⁵、飯田 直也⁶、遠藤 斗志也³、久堀 徹²、
吉田 賢右³、野地 博行¹ (¹ 東京大学, ² 東京工業大学, ³ 京都産業大学, ⁴ 理化学研究所, ⁵ 大阪大学, ⁶ 早稲田大学)

1 分子モーターが動いている瞬間を見る: 時分割動的 X 線結晶構造解析による哺乳類 F1 の回転力発生機構の分析 (ポスター発表, 口頭発表)

ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会) 2017.12.6-9
神戸ポートアイランド

(4)知財出願

①国内出願 (0 件)

②海外出願 (0 件)

③その他の知的財産権
特になし

(5)受賞・報道等

①受賞

(1) 植田依里 (M2) 2013 年 5 月 日本生化学会中部支部例会奨励賞

(2) Jiyao Song (M2) 2013 年 10 月 DynaMito 2013: The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria, ポスター賞 (EMBO Journal Silver Prize)

* (3) 遠藤斗志也 2016 年 4 月 文部科学大臣表彰科学技術賞

(4) 遠藤斗志也 2017 年 9 月 日本学術振興会科研費審査委員表彰

②マスコミ(新聞・TV等)報道

(1) プレス発表 (2013 年 4 月 26 日 名古屋大学発表) 「ミトコンドリア機能に必須の脂質「カルジオリピン」合成の鍵を握る酵素 (CDP-ジアシルグリセロール合成酵素) の発見」(田村ら, *Cell Metabolism* 論文)

・科学新聞 2013 年 5 月 31 日 1 面 「ミトコンドリア機能に必須 「カルジオリピン」合成の鍵握る酵素特定」

・日経産業新聞 2013 年 5 月 5 日 「ミトコンドリア活動に必要な 脂質の合成酵素解明」

(2) プレス発表 (2015 年 7 月 23 日 京都産業大学と JST の共同発表) 「ミトコンドリア外膜から内膜へリン脂質分子を輸送するタンパク質 Ups1-Mdm35 複合体の立体構造及び脂質輸送メカニズムを初めて解明」(渡辺ら, *Nature Communications* 論文)

- ・京都新聞 2015 年 8 月 22 日朝刊 9 面カラー「ミトコンドリアの機能維持する脂質：運び役タンパク質構造解明：病気原因探るヒントに」
- ・日刊工業新聞 2015 年 8 月 6 日 23 面「リン脂質輸送分子構造を解明：供給正常化に道」
- ・科学新聞 2015 年 8 月 28 日 2 面「ミトコンドリア外膜から内膜へリン脂質輸送：タンパク質の立体構造解明」

(3) プレス発表 (2015 年 9 月 24 日 京都産業大学, JST, 産総研の共同発表)「ミトコンドリアの膜透過装置 TOM 複合体の相互作用地図の作成により, タンパク質搬入口として働く仕組みを解明」(塩田ら, *Science* 論文)

- ・京都新聞 2015 年 9 月 25 日朝刊 24 面カラー「ミトコンドリアの搬入装置：タンパク質の性質別に経路」
- ・日経新聞 2015 年 9 月 28 日朝刊 13 面「ミトコンドリア：働きの一部解明」

(4) 京都新聞 2015 年 9 月 26 日朝刊 9 面カラー「探究人：ミトコンドリアが作られる仕組み：脂質の運び役，構造を解析，もっと健康になるために」

(5) プレス発表 (2016 年 5 月 立教大学, JST の共同発表) 細胞内 cAMP 濃度と PKA によるリン酸化機構が不良ミトコンドリアの排除機構に関与することを発見した。これにより, 神経細胞において障害は無いが一時的に活性が低下しているミトコンドリアを排除機構から守るメカニズムが示された (赤羽ら, *Mol. Cell* 論文)。この成果は, 神経細胞の分化とパーキンソン病の病態解明に繋がることが期待され, 立教大学と科学技術振興機構のプレスリリースをもとに新聞で報道された。

- ・ 2016 年 5 月 9 日化学工業日報「ミトコンドリアの品質管理機構解明」

(6) プレス発表 (2017年12月18日 京都産業大学)「小胞体とミトコンドリア間のコンタクト部位をつくる ERMES 複合体の構成因子の立体構造と脂質輸送メカニズムの解明」(河野ら, *J. Cell Biol.* 論文)

- ・ 2017年12月30日 京都新聞朝刊20面「脂質輸送 仕組み解明：京産大教授ら 心筋症など関連研究期待」

(7) プレス発表 (2018年4月19日 山形大学・京都産業大学)「オルガネラ (細胞小器官) 間相互作用の可視化に成功～細胞内構造のこれまでの概念を一新～」(柿元ら, *Sci. Rep.* 論文)

- ・ 2018年4月19日 山形新聞26面「相互作用の可視化成功, 神経変性疾患治療へ応用, 期待」

③その他

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

②社会還元的な展開活動

本研究成果を, インターネット上の研究室のホームページ (<http://endolab.jp/wp/>), 研究室の Facebook (<https://www.facebook.com/endo.lab>), 大学のホームページ (<http://www.kyoto-su.ac.jp/>) で公開し, 一般に情報提供している。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2014年7月26日	日本科学未来館研究棟セミナー(非公開)	日本科学未来館	約15名	科学未来館で行っているCREST研究を科学未来館のサイエンスコーディネーターらスタッフ向けに公開した。講演＋ラボ見学ツアー。
2014年8月23-24日	Miraikan オープンラボ「ラボたんけん！生命を解く鍵。それは美しき結晶と、交通管制官？」	日本科学未来館	約40名	科学未来館で行っているCREST研究を一般市民(小学生から大人まで)に公開した。講演＋ラボ見学ツアー。
2014年8月28-29日	遠藤チームリトリート(非公開)	名古屋大学 菅島臨海実験所	約20名	チーム内で各グループの研究進捗状況を報告し、それについて議論、今後の方針を検討した。
2014年12月12日	スーパーサイエンスハイスクール	日本科学未来館	約30名	科学未来館で行っているCREST研究をSSHとして見学に来た高校生に公開した。講演＋ラボ見学ツアー。
2015年8月10日	ワールドバイオテクノロジーツアー・オープンラボ	日本科学未来館	約30名	科学未来館で行っているCREST研究を一般市民(小学生から大人まで)に公開した。講演＋ラボ見学ツアー。
2015年9月15日	遠藤チームリトリート(公開セミナー以外は非公開)	新潟大学	約30名	チーム内で各グループの研究進捗状況を報告し、それについて議論、今後の方針を検討した。また本チームの岡教授と関連分野の研究者(神吉教授)による公開セミナーを行った。
2015年9月29日	日本科学未来館オープンラボ(非公開)	日本科学未来館	約10名	科学未来館で行っているCREST研究を科学未来館のサイエンスコーディネーターらスタッフ向けに公開した。講演＋ラボ見学ツアー。
2015年10月23-24日	日本科学未来館オープンラボ「ミトコンドリア生合成プロジェクト」	日本科学未来館	約30名	科学未来館で行っているCREST研究を一般市民(小学生から大人まで)に公開する。講演＋ラボ見学ツアー。
2015年12月12日	スーパーサイエンスハイスクール	日本科学未来館	約30名	科学未来館で行っているCREST研究をSSHとして見

				学に来た高校生(福岡県立東筑高校1年)に公開した。講演+ラボ見学ツアー。
2016年7月30-31日	未来館オープンラボ2016夏「ようこそ,未来を生み出す現場へ!」	日本科学未来館	約60名	科学未来館で行っているCREST研究を一般市民(小学生から大人まで)に公開した。「命を支えるタンパク質」のタイトルで,講演+ラボ見学ツアー
2016年8月8日	ワールド・バイオテクノロジー・ツアー	日本科学未来館	約40名	CREST研究のミトコンドリアのタンパク質の結晶化実験に関するラボツアーを行い,大腸菌を用いた組換えタンパク質の生産,タンパク質精製そして結晶化の工程を見学してもらい,来館者と直接対話した
2015年9月24日	遠藤チームリトリート(非公開)	山形大学	約30名	チーム内で各グループの研究進捗状況を報告し,それについて議論,今後の方針を検討した。また本チーム関連分野の研究者・企業関係者にも参加・発表いただいた。
2016年10月29-30日	未来館オープンラボ2016秋「Incoming Reality!」	日本科学未来館	約60名	科学未来館で行っているCREST研究を一般市民(小学生から大人まで)に公開した。「命を支えるタンパク質」のタイトルで,講演+ラボ見学ツアー
2017年8月19-20日	未来館オープンラボ2017夏「研究室ツアー」	日本科学未来館	約60名	科学未来館で行っているCREST研究を一般市民(小学生から大人まで)に公開した。「ミトコンドリアとタンパク質」のタイトルで,講演+ラボ見学ツアー
2017年9月22日	遠藤チームリトリート(非公開)	愛媛大学	約50名	チーム内で各グループの研究進捗状況を報告し,それについて議論,今後の方針を検討した。また本チーム関連分野の研究者参加・発表いただく予定。
2017年10月21,22日	未来館オープンラボ2017夏「研究室ツアー」	日本科学未来館	約60名	科学未来館で行っているCREST研究を一般市民(小学生から大人まで)に公開した。「ミトコンドリアとタンパク質」のタイトルで,講演+ラボ見学ツアー

2017年11月4日	世界科学館サミット	日本科学未来館	約30名	サミットに参加された方々に研究内容を紹介。主に自動結晶化装置の実演・説明を行った。
2017年11月26日	サイエンティストクエスト「細胞の中ではたらく目に見えない実働部隊”タンパク質” – 「かたち」を調べて「はたらき」を理解する」	日本科学未来館	約100名	当研究室の荒磯裕平研究員が、未来館5階コ・スタジオにおいてサイエンティストクエストを開催した。本人が研究者を志すまでの過程から、専門分野であるタンパク質科学、さらには現在の主たる研究テーマであるミトコンドリアタンパク質の構造研究についてプレゼンテーションを行った。

§6 最後に

ミトコンドリアの生合成と機能維持には、ミトコンドリアを構成するタンパク質と脂質の輸送、外膜と内膜の機能構造の構築維持、そしてERなどとのコンタクトが重要である。タンパク質輸送については、すでに多くの因子を発見同定していたので、メカニズムの理解に向けて、現在圧倒的に欠けている構造情報の取得を重要目標とした。その結果、モデリングと部位特異的光架橋で TOM 複合体のような膜タンパク質複合体についても、アミノ酸残基レベルの空間分解能でマッピングを行うことができ、かつ複数の複合体間の動的平衡についても解明できたのは、大きな成果であった。一方この間、クライオ電子顕微鏡(EM)観察の技術革新があり、大量調製が容易ではなく、かつ組成が不安定なミトコンドリアのトランスロケータ複合体(TOM複合体やSAM複合体等)についても、膜タンパク質複合体丸ごとを対象とする原子レベルの分解能での構造解析の可能性が開けた。わが国における最新装置の導入の遅れ、試料調製のノウハウ不足やハイスループットのデータ解析システムの整備の遅れなどの困難があったが、東大吉川研との共同研究、ドイツの Roland Beckman 研との共同研究を通じて、試行錯誤と経験の積み重ねで乗り越えつつある。今年度で CREST 研究が終了してしまうことが何とも痛恨の極みである。

一方脂質輸送については、プロジェクト開始時点では経路も因子もほとんど分かっていなかったが、その後、様々な因子の同定、因子の構造決定、*in vitro*での脂質輸送アッセイ系の確立などに成功し、この分野の研究の発展に大きく貢献できた。さらに印象的なのは、プロジェクト開始当時はまだ一部しか解明されていなかった異種オルガネラ間コンタクトが次々に発見され、オルガネラの構造と機能に関する描像が大きく変わりつつあることである。それでもまだオルガネラ間コンタクトの実体解明は不十分であり、またその機能を解明する実験手法の不足が問題である。今後オルガネラ間コンタクトの挙動を細胞内でモニターする方法、*in vitro*で機能を再構成する手法等の開発が鍵を握ると考えられる。

本プロジェクトでは、真核生物のモデル系として出芽酵母を使った研究に重点を置く一方、岡グループらの哺乳動物を使った研究が補完的役割を果たし、クリステ構造形成機構の解明、PINK1-Parkin系のPKAによるリン酸化を介した制御などの重要な成果が得られた。酵母と哺乳動物ではタンパク質輸送や脂質輸送では共通する部分が多いが、一方で哺乳動物特有の膜構造制御や品質管理のシステムの重要性も病態との関連などから明らかであり、両者を適切に組み合わせ、補完的に研究を進めることの重要性を示すことができたかと思う。

本プロジェクトが始まってから、研究代表者の遠藤が名古屋大学から京都産業大学に移り、研究拠点が名古屋(田村グループ)、京都+東京(遠藤グループ)の3箇所に分断されたが、大きな支

障は生じなかった。この分断に伴い、名古屋大学から山形大学に PI として転出した田村グループの新ラボ立ち上げに、CREST の研究支援が大きく貢献することができた。チーム全体の交流と連携をはかるために毎年リトリートを行ってきたが、チーム外の関連研究者の参加希望などもあり、重要な研究交流の場として機能している。



28年9月 研究室 (+CREST チーム) のリトリート (山形)