

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07000

研究課題名(和文) 翻訳の速度論的制約に立脚した全く新しい小胞体膜挿入機構の解明

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism underlying insertion of membrane proteins kinetically unfavorable for the cotranslational insertion pathway into the endoplasmic reticulum membrane

研究代表者

山本 泰憲 (YAMAMOTO, YASUNORI)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30467659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：分泌経路上のすべての膜タンパク質はまず小胞体膜に挿入され、その後適切な膜系へと輸送される。主要な膜挿入経路として膜透過装置トランスロコンによる翻訳と共役した経路がある一方、C末端近傍にシグナル配列を持つ膜タンパク質は膜挿入前に翻訳が完了してしまうため、トランスロコンでは膜挿入できない。本研究ではこのような翻訳の速度論的制約下にある膜タンパク質の膜挿入機構を解析した結果、2つのペルオキシソーム形成因子PEX19とPEX3が協調して膜変形タンパク質を翻訳後に小胞体膜へ挿入していることを明らかにした。また、テイルアンカー型タンパク質の翻訳後膜挿入を調節する新規小胞体膜タンパク質を同定した。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins destined for the secretory pathway are first inserted into the endoplasmic reticulum (ER) membrane, followed by delivery to their destinations. Translocon is the most prominent machinery that cotranslationally inserts membrane proteins into the ER membrane. However, if membrane proteins have the ER targeting information near the C-termini, their protein translation reaction will terminate before membrane insertion, precluding taking the cotranslational pathway guided by translocon. In this study, we examined the molecular mechanism how the membrane proteins kinetically unfavorable for translocon were inserted into the ER membrane. We eventually revealed that two peroxisome biogenesis factors, PEX19 and PEX3, constituted an alternative machinery that posttranslationally inserted membrane-shaping proteins into the ER membrane. Besides, we identified a novel ER membrane protein that regulated the posttranslational membrane insertion of tail-anchored proteins.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体 膜挿入装置 ペルオキシソーム形成因子 膜変形タンパク質 reticulon ヘアピン型膜タンパク質 テイルアンカー型タンパク質 CAML-WRB複合体

## 1. 研究開始当初の背景

分泌経路上のすべての膜タンパク質はまず小胞体膜に挿入され、その後適切な膜系へと輸送されることから、小胞体における膜タンパク質の膜挿入機構を理解することは生命科学における大変重要な課題である。主要な膜挿入システムとして膜透過装置トランスロコンによる翻訳と共役した経路がある一方、トランスロコンでは膜挿入できないトポロジーをもつ膜タンパク質も多く存在する。リボソームの構造上、C末端40アミノ酸は翻訳完了後にリボソームの外に出てくる。このため、C末端40アミノ酸以内にシグナル配列となる膜貫通領域を持つテイルアンカー型タンパク質は、トランスロコンによる翻訳と共役した膜挿入が不可能であり、翻訳完了後に膜挿入される。私どもはテイルアンカー型タンパク質の非トランスロコン型膜挿入装置が2つの小胞体膜タンパク質 CAML と WRB からなる分子複合体 (CAML-WRB 複合体) であることを明らかにしている。

他方、シグナル認識粒子がシグナル配列の認識にかかる時間とリボソームの翻訳速度を考慮すると、C末端40アミノ酸から100-120アミノ酸の間にシグナル配列となる膜貫通領域を持つ膜タンパク質はシグナル認識粒子が認識する前に翻訳が完了するため、トランスロコンによる翻訳と共役した膜挿入が速度論的に不可能となる。このような速度論的制約下にある膜タンパク質の膜挿入はトランスロコンや CAML-WRB 複合体ではない、未知の第3の小胞体膜挿入装置により行われていると予想されるが、その分子実体は全く不明である。また興味深いことに、速度論的制約下にある膜タンパク質にはC末端へアピン構造膜貫通領域を有する小胞体膜変形タンパク質が多く含まれることから、未知の第3の小胞体膜挿入装置と小胞体膜形態との間に密接な機能関係が存在する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、翻訳の速度論的な制約の視点から既存の膜挿入装置では膜挿入が説明できない膜タンパク質に独自に着眼することで、トランスロコンでも CAML 複合体でもない、未知の第3の小胞体膜挿入装置の分子実体を世界に先駆けて解明する。試験管内再構成系を駆使して同定した膜挿入装置の作動機構を明らかにする。膜挿入装置の主要な基質が小胞体膜変形タンパク質であることに基づき、膜挿入制御と小胞体膜構造の間の機能関係を明らかにする。得られた知見に基づき、速度論的制約をもつ膜タンパク質を小胞体膜に配向挿入する分子メカニズムを世界に先駆けて解明するとともに、小胞体の膜形態の生理的役割、意義について新たな概念を生み出す。

## 3. 研究の方法

(1) ウサギ網状赤血球抽出液による膜タンパク質の *in vitro* 翻訳

N 末に FLAG タグをつけた Arl6IP1 または reticulon 4C、C 末に opsin タグをつけた Sec61 $\beta$  を T7 プロモーターの下流にクローニングし、これを鋳型にして T7 RNA ポリメラーゼにより RNA を合成した。合成した RNA を、翻訳反応に必要な成分 (tRNA や ATP エネルギー再生系等) を添加したウサギ網状赤血球抽出液 (Promega 社 rabbit reticulocyte lysate system) と混合し、30°C で 90 分間インキュベートして翻訳反応を進行させ、膜タンパク質を *in vitro* 翻訳した。

(2) 小胞体膜挿入の試験管内アッセイ法

HeLa 細胞または HEK293 細胞をジギトニンを含む buffer で処理して細胞膜のみを選択的に除去し、セミインタクト細胞を調製した。セミインタクト細胞にウサギ網状赤血球抽出液で *in vitro* 翻訳した膜タンパク質を添加し、30°C で 90 分間インキュベートして小胞体膜挿入反応を進行させた。Arl6IP1 と reticulon 4C の膜挿入は FLAG 抗体による免疫染色を行い、小胞体膜への局在で検出した。Sec61 $\beta$  の膜挿入は opsin タグへの糖鎖修飾による電気泳動の移動度の変化で検出した。

(3) Arl6IP1 結合タンパク質の同定

FLAG-Arl6IP1 をウサギ網状赤血球抽出液で *in vitro* 翻訳し、FLAG 抗体を固相化したアガロースレジンでプルダウンした。レジンを過剰の FLAG ペプチドを含む buffer で懸濁し、FLAG-Arl6IP1 と共に溶出された Arl6IP1 結合タンパク質を電気泳動で分離後、質量分析で同定した。

(4) 免疫染色による細胞内局在の検討

HeLa 細胞に FLAG タグをつけた PEX19 C296S (脂質修飾欠損変異体) と HA タグをつけた Arl6IP1 または reticulon 3A を Effectene (Qiagen 社) でトランスフェクションし、FLAG 抗体、HA 抗体および PDI 抗体 (小胞体マーカー) で免疫染色して小胞体膜への局在を検討した。HeLa 細胞に PEX19 siRNA を Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher 社) でトランスフェクションし、reticulon 3 抗体および PDI 抗体で免疫染色して小胞体膜への局在を検討した。HeLa 細胞に myc タグをつけた p47、HA タグをつけた CAML、T7 タグをつけた WRB を Effectene でトランスフェクションし、myc 抗体、HA 抗体および T7 抗体で免疫染色して小胞体膜での共局在を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 膜変形タンパク質の小胞体膜挿入装置の解明

速度論的制約下にある膜タンパク質として、小胞体膜変形タンパク質 Arl6IP1 と reticulon に着目し、試験管内膜挿入アッセイを用いて小胞体膜挿入を解析した。その結果、ウサギ網状赤血球抽出液で *in vitro* 翻

訳した Arl6IP1 および reticulon 4C はセミインタクト HeLa 細胞の小胞体に翻訳完了後に膜挿入された。このことから、膜変形タンパク質を膜挿入する未知の第3の小胞体膜挿入装置が実際に存在することを実験的に確認した。この小胞体膜挿入装置の構成因子を物質的に明らかにするために、ウサギ網状赤血球抽出液中に含まれる Arl6IP1 結合タンパク質を精製し、質量分析で同定したところ、ペルオキシソーム形成因子 PEX19 を単離した。PEX19 と様々な小胞体膜タンパク質の結合を解析した結果、PEX19 は Arl6IP1 や reticulon 4C 等の reticulon homology domain (RHD) と呼ばれる2つのショートヘアピン型膜貫通領域からなる進化的に保存されたドメインを持つ小胞体膜変形タンパク質ファミリーの新生鎖を選択的に認識し、結合していた。PEX19 の脂質修飾欠損変異体の過剰発現や siRNA ノックダウンは Arl6IP1 や reticulon 3 の小胞体膜への局在を障害した。このことから、PEX19 は脂質修飾を介して膜変形タンパク質の新生鎖を小胞体膜へターゲティングしていることが明らかとなった。PEX3 は小胞体膜に局在し、PEX19 の受容体として機能することが知られている。そこで、PEX3 が膜挿入に関与しているかどうかを、試験管内膜挿入アッセイを用いて検討した。PEX3 を siRNA ノックダウンしたセミインタクト HeLa 細胞の小胞体は、ウサギ網状赤血球抽出液で *in vitro* 翻訳した Arl6IP1 および reticulon 4C の膜挿入を著しく低下した。このことから、PEX3 が小胞体膜挿入装置の構成因子であることが明らかになった。PEX19 と PEX3 以外のペルオキシソーム形成因子の siRNA ノックダウンは膜挿入に影響しなかったことから、小胞体膜挿入はペルオキシソーム形成に依存していないことがわかった。以上の結果から、速度論的制約下にある膜タンパク質を膜挿入する未知の第3の小胞体膜挿入装置の分子実体が PEX19 と PEX3 からなる分子複合体 (PEX19-PEX3 システム) であること、PEX19-PEX3 システムは RHD をもつ膜変形タンパク質を選択的に翻訳後に膜挿入していることが明らかとなった (図1)。

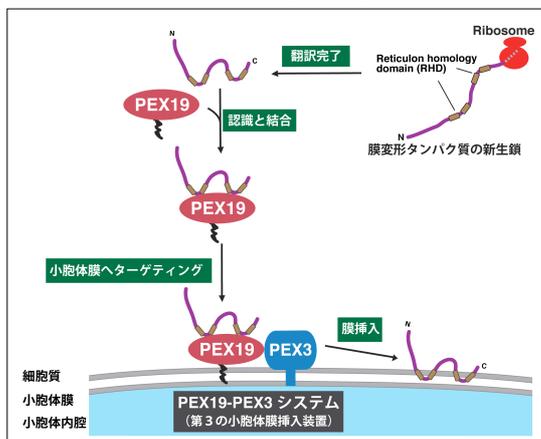


図1：PEX19-PEX3 システムによる膜変形タンパク質の翻訳後膜挿入機構

PEX19 以外に Arl6IP1 の新生鎖に結合するタンパク質をウサギ網状赤血球抽出液から探索した結果、トランスロコン経路で働くシグナル認識粒子のサブユニット SRP54 を同定した。このことから、RHD を持つ小胞体膜変形タンパク質はトランスロコンによる翻訳と共役した膜挿入経路も取りうると考えられた。さらに、Arl6IP1 新生鎖に結合するタンパク質として、膜タンパク質のプロテアソーム分解に関与するシャペロン Bat3 を同定した。PEX19 ノックダウンにより膜挿入されなかった reticulon 3 はプロテアソームで速やかに分解されていた。以上の結果を総合すると、RHD を持つ小胞体膜変形タンパク質の新生鎖は先ず Bat3 に認識されて膜挿入か分解かの選別が行われ、その後、PEX19 に受け渡されて PEX3 により小胞体膜へ挿入されると考えられた (図2)。このような PEX19-PEX3 システムによる翻訳後膜挿入経路は、翻訳の速度論的制約のためにトランスロコン経路をとることに失敗した小胞体膜変形タンパク質を膜挿入するためのバックアップ経路として存在している可能性が考えられた (図2)。また、ペルオキシソーム膜タンパク質の一部は小胞体から出芽した膜小胞により輸送されることから、PEX19-PEX3 システムによる翻訳後膜挿入を作用点として、小胞体膜変形とペルオキシソーム生合成が協調している可能性が示唆された (図2)。

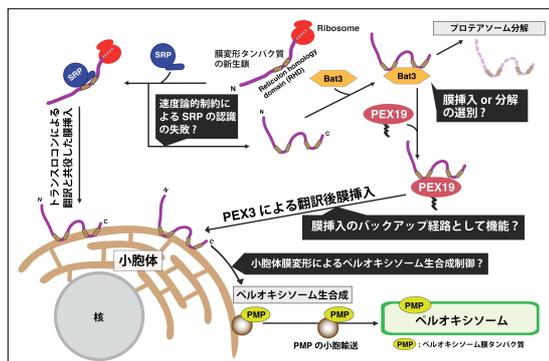


図2：PEX19-PEX3 システムによる膜挿入の生理的役割

## (2) テイルアンカー型タンパク質の膜挿入制御機構

Reticulon に結合する新規小胞体膜タンパク質を同定した。この新規小胞体膜タンパク質は N 末細胞質領域に coiled-coil ドメイン、C 末に膜貫通領域を持ち、4 つのメンバーからなるファミリーを形成していた。組換えタンパク質による結合実験と免疫共沈降実験の結果、ファミリーメンバーの1つ(p47)はテイルアンカー型タンパク質の小胞体膜挿入装置の構成因子である CAML と WRB に競合的に結合していた。p47 は free の CAML 及び WRB と小胞体で共局在したが、CAML-WRB 複合体とは共局在しなかった。次に、p47 がテイルアンカー型タンパク質の膜挿入に関与しているかどうかを、試験管内膜挿入アッセイ

を用いて検討した。コントロールベクターを発現させたセミインタクト HEK293 細胞の小胞体と比べて、p47 を過剰発現させたセミインタクト HEK293 細胞の小胞体は、ウサギ網状赤血球抽出液で *in vitro* 翻訳した Sec61  $\beta$  の膜挿入を著しく低下した。以上の結果から、p47 は CAML-WRB 複合体の形成を調節することで、テイルアンカー型タンパク質の翻訳後膜挿入を負に制御していると考えられた (図 3)。

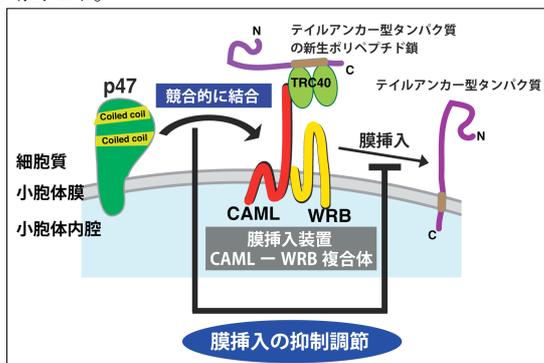


図 3: p47 によるテイルアンカー型タンパク質の膜挿入制御

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Yamamoto, Y. and Sakisaka, T.

The peroxisome biogenesis factors posttranslationally target reticulon homology domain-containing proteins to the endoplasmic reticulum membrane.

*Scientific Reports*, 8 巻, 2322 (2018) 査読有  
doi:10.1038/s41598-018-20797-0.

② Yamamoto, Y., Yurugi, C., and Sakisaka, T.

The number of the C-terminal transmembrane domains has the potency to specify subcellular localization of Sec22c.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 487 巻 2 号, 388-395 (2017) 査読有  
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.04.071.

[学会発表] (計 5 件)

① 山本 泰憲、匂坂 敏朗

ペルオキシソーム形成因子による小胞体膜変形タンパク質 reticulon の翻訳後膜挿入機構

2017 年度生命科学系学会合同年次大会

2017 年 12 月 6 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

② 梶保 博昭、山本 泰憲、匂坂 敏朗

ユビキチンリガーゼ活性による小胞体の新しい形態調節機構

2017 年度生命科学系学会合同年次大会

2017 年 12 月 8 日, 9 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

③ 山本 泰憲、萬木 千聖、匂坂 敏朗

小胞輸送調節タンパク質 Sec22C は C 末膜貫通領域の数により細胞内局在を制御する

第 64 回日本生化学会 近畿支部例会

2017 年 5 月 27 日 大阪大学 (大阪府)

④ 梶保 博昭、姜 山、山本 泰憲、匂坂 敏朗

ユビキチンリガーゼによる小胞体の形態制御機構

第 64 回日本生化学会 近畿支部例会

2017 年 5 月 27 日 大阪大学 (大阪府)

⑤ 内田 安則、山本 泰憲、出来 宏晃、匂坂 敏朗

小胞体膜タンパク質による極長鎖脂肪酸合成の制御

第 64 回日本生化学会 近畿支部例会

2017 年 5 月 27 日 大阪大学 (大阪府)

[図書] (計 1 件)

① 山本 泰憲、匂坂 敏朗

化学同人 DOJIN BIOSCIENCE シリーズ『メンブレントラフィック』 PartIII: 高次生体機能を支えるメンブレントラフィック 10 章 神経伝達物質放出を支えるメンブレントラフィック 262(144-154) 2016 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 泰憲 (YAMAMOTO, Yasunori)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30467659

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

匂坂 敏朗 (SAKISAKA, Toshiaki)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 30467659

(4) 研究協力者

( )