

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11537

研究課題名(和文)膜タンパク質の段階的な細胞内局在化機構の解明と細胞内局在化経路予測法の確立

研究課題名(英文)Elucidation of the stepwise intracellular localization mechanism of membrane proteins and establishment of prediction methods for intracellular localization pathways

研究代表者

池田 有理 (Mukai-Ikeda, Yuri)

明治大学・理工学部・専任准教授

研究者番号：30371082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではI型・II型膜タンパク質のシグナルペプチド・膜貫通領域・シグナルアンカーの配列解析から細胞内局在化の各段階における局在性決定要因を以下7つの課題を通して考察した。1) シグナルペプチドおよびシグナルアンカー周辺配列の特徴抽出、2) II型膜タンパク質シグナルアンカーとGFPの融合タンパク質の細胞内局在性観察、3) II型膜タンパク質の細胞膜局在化における認識・仕分け機構の調査、4) 膜貫通領域アラインメント方法の改良、5) ゴルジ内局在化機構解明のための膜貫通領域特徴抽出、6) 小胞体逆輸送タンパク質の膜貫通領域の役割、7) 糖タンパク質の細胞内局在経路と糖鎖修飾の糖種との関係

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、正確な細胞内局在予測が困難であった膜タンパク質に特化して、バイオインフォマティクスと検証実験の組合せによって細胞内局在化要因を段階的に明らかにした。また膜タンパク質のアミノ酸配列をもとに、細胞内局在化経路だけでなく、修飾を受けている糖の種類を予測することも可能となった。本研究課題の知見から得られる、細胞内の任意の位置へ膜タンパク質を確実に送達する工学的技術は、遺伝子治療や分子マーカー、DDS、農作物品種改良など、医療・創薬分野をはじめ、農学分野にも応用可能である。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we examined the localization determinants at each stage of subcellular localization through sequence analysis of the signal-peptides, transmembrane regions, and signal-anchors of type I and type II membrane proteins following seven themes. 1) Characterization of signal-peptides and sequences surrounding signal-anchors, 2) Observation of subcellular localization of signal-anchor-GFP fusion proteins, 3) Recognition and sorting mechanisms in plasma membrane localization of type II membrane proteins 4) Improvement of transmembrane region alignment method, 5) Transmembrane region characteristics extraction for elucidation of intra-Golgi localization mechanism, 6) Role of transmembrane region of reverse endoplasmic reticulum transport protein, 7) Glycoprotein relationship between intracellular localization pathway and sugar types of glycosylation.

研究分野：生命情報科学

キーワード：バイオインフォマティクス 細胞分子生物学実験 膜タンパク質 膜貫通領域 細胞内局在化経路 膜交通 糖鎖修飾 糖種

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は創薬のターゲットとしてよく知られ、シグナル伝達や物質輸送、エネルギー変換などの生命活動において重要な役割を果たしている。したがって、膜タンパク質を細胞内の適切な場所に送達する細胞内局在機構は、DDS や遺伝子治療などにも応用できる。しかし、多くの膜タンパク質は、細胞内局在化の初期に小胞体に挿入されるためのシグナルペプチドを除けば、最終的な局在場所に送達されるための機構が各段階で明らかにされていない。膜タンパク質は創薬のターゲットとして注目されているにも関わらず、その細胞内局在機構の詳細や局在決定要因の研究が遅れている。そこで本研究課題では、核心をなす学術的「問い」として、以下の2点を設定した。

[1] 膜タンパク質の細胞内局在化の各段階において、局在性を決定している要因は何か？

[2] 膜タンパク質の細胞内局在“経路”予測は可能か？

本研究課題では、膜貫通領域を1本持つI型・II型膜タンパク質を対象に、

- 1) I型・II型膜タンパク質の細胞内局在経路の特定
- 2) II型膜タンパク質シグナルアンカー周辺配列の特徴抽出
- 3) I型膜タンパク質シグナルペプチド配列の特徴抽出
- 4) I型膜タンパク質膜貫通領域周辺配列の特徴抽出
- 5) 末端タグ配列の特徴抽出

を行うことにより、上記の「問い」[1]を明らかにする。さらに、2)～5)で得られたパラメータに基づく6)『膜タンパク質細胞内局在経路予測法』の開発を通して、上記の「問い」[2]を達成する。

本研究課題では、これまでのタンパク質細胞内局在予測法と異なり、最終局在位置までの局在化経路を予測する方法を開発する。『細胞内局在化経路予測法』開発への取り組みは、他に類を見ない。正確な細胞内局在予測が困難であった膜タンパク質に特化して、バイオインフォマティクスと検証実験の組合せによって細胞内局在化要因を段階的に明らかにする。これらの細胞内局在化要因は、信ぴょう性の高い細胞内局在経路予測のパラメータとして利用できる。また本研究課題は、膜タンパク質細胞内局在機構を段階的に理解する理学的『基礎研究』から、細胞内局在経路予測法の開発までの工学的『応用研究』を期間内に一貫して行うことにより、膜タンパク質の細胞内局在機構に関する包括的な研究となり得る。研究分担者の先行研究により、タンパク質の糖鎖修飾において、糖の種類が細胞内局在化経路に依存していることが明らかにされている。本研究課題により、膜タンパク質のアミノ酸配列をもとに、細胞内局在化経路だけでなく、修飾を受けている糖の種類をも予測することが可能となる。本研究課題の知見から得られる、細胞内の任意の位置へ膜タンパク質を確実に送達する工学的技術は、遺伝子治療や分子マーカー、DDS、農作物品種改良など、医療・創薬分野をはじめ、農学分野にも応用可能である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、I型・II型の膜タンパク質を対象に、シグナルペプチド・膜貫通領域やシグナルアンカー配列・末端タグ配列から細胞内局在化経路ごとの特徴を抽出し、判別解析を行うことにより、膜タンパク質の細胞内局在化の各段階において局在性を決定している要因を明らかにする。また、GFP融合タンパク質発現細胞を用いた各要因の検証実験を併せて行う。また、小胞体逆輸送型のI型・II型膜タンパク質の膜貫通領域の特徴を抽出し、逆輸送が行われないI型・

II 型膜タンパク質の膜貫通領域の特徴と比較することにより、膜貫通領域の役割を明らかにする。また膜貫通領域のアラインメント方法を改良し、アラインメント位置特異的なアミノ酸出現傾向の議論の明確化を目指す。

なお申請時は、上記で得られた各要因を利用して細胞内局在化経路を予測する方法を開発し『膜タンパク質細胞内局在経路予測法』として Web 公開を行う予定であったが、研究の進行に伴い、当初計画には無かった小胞体逆輸送型の I 型・II 型膜タンパク質の膜貫通領域の特徴抽出および膜貫通領域アラインメント方法の改良が必要になったため、当該研究の目的および研究計画、研究の方法を若干変更した。

### 3. 研究の方法

研究期間内に以下 9 テーマを実施し、細胞内局在化経路予測に必要な要因を明らかにした。

- (1) I 型・II 型膜タンパク質の細胞内局在経路の特定
- (2) II 型膜タンパク質シグナルアンカー周辺配列の特徴抽出
- (3) II 型膜タンパク質シグナルアンカーと GFP の融合タンパク質の細胞内局在性観察
- (4) I 型膜タンパク質シグナルペプチド配列および膜貫通領域周辺配列の特徴抽出
- (5) II 型膜タンパク質の細胞膜局在化における認識・仕分け機構の調査
- (6) II 型膜タンパク質の膜貫通領域アラインメント方法の改良
- (7) ゴルジ内局在化機構解明のための膜貫通領域特徴抽出
- (8) 小胞体逆輸送タンパク質の膜貫通領域の役割
- (9) 糖タンパク質の細胞内局在経路と糖鎖修飾の糖種との関係

### 4. 研究成果

#### (1) I 型・II 型膜タンパク質の細胞内局在経路の特定

従来の細胞内局在予測法のデータセットのように最終的な細胞内局在位置で分類するのではなく、本研究課題では最終局在位置に至るまでの経路ごとに、I 型・II 型膜タンパク質を分類した。UniProt/KnowledgeBase のアップデートに伴うデータ更新の準備も整えた。

#### (2) II 型膜タンパク質シグナルアンカー周辺配列の特徴抽出

細胞内局在経路ごとに、II 型膜タンパク質シグナルアンカー配列の特徴抽出および判別解析、検証実験を行った。小胞体膜からゴルジ体膜や細胞膜へ輸送されるタンパク質のシグナルアンカー配列は、小胞体膜に留まるタンパク質のシグナルアンカー配列から区別できた。ゴルジ膜と細胞膜局在のシグナルアンカー配列は、特に高精度に区別することができた ( Kikegawa, *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2018 )

#### (3) II 型膜タンパク質シグナルアンカーと GFP の融合タンパク質の細胞内局在性観察

II 型膜タンパク質のシグナルアンカー領域と GFP の融合タンパク質の発現ベクターを 9 パターン作製し、HeLa 細胞で発現させ、GFP 蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で確認した。小胞体局在性 II 型膜タンパク質のシグナルアンカー領域周辺配列だけを GFP と融合しても、GFP 蛍光は小胞体で確認された。ゴルジ膜局在性 II 型膜タンパク質のシグナルアンカーと GFP の融合タンパク質はゴルジ膜に、細胞膜局在性 II 型膜タンパク質のシグナルアンカーと GFP の融合タンパク質は細胞膜に、それぞれ局在化された。小胞体膜・ゴルジ膜・細胞膜への局在化には膜貫通領域周辺配列が本質的であることを明らかにできた ( Mukai, *et al.*, *Proceedings* 2019, 2020 ) ( 論文投稿準備中 )

#### (4) I 型膜タンパク質シグナルペプチド配列および膜貫通領域周辺配列の特徴抽出

細胞内局在経路ごとに、I型膜タンパク質のシグナルペプチド領域や膜貫通領域周辺配列の特徴抽出および判別解析を行い、II型膜タンパク質シグナルアンカー配列と比較した(Mukai, *et al.*, Proceedings 2020)。

#### (5) II型膜タンパク質の細胞膜局在化における認識・仕分け機構の調査

AAindexを用いて、II型膜タンパク質における膜貫通領域周辺配列のアミノ酸配列解析を行い、細胞膜を局在化経路に持つタンパク質の認識・仕分け機構の調査を行った。その結果、細胞膜局在タンパク質では膜界面に出現するアミノ酸の二次構造選択性・電荷の出現傾向が特徴的であった(渡辺・古賀・向井, 学会発表 2021)。

#### (6) II型膜タンパク質の膜貫通領域アラインメント方法の改良

II型膜タンパク質の膜貫通領域を抽出して膜貫通領域の先頭および末端を正確に整列させる方法を考案した。UniProtの膜貫通領域アノテーションと、平均疎水性値から抽出した膜貫通領域を比較したところ、特に小胞体やゴルジ体のII型膜タンパク質の膜貫通領域において頻繁にずれていることがわかった。膜貫通領域における位置特異的なアミノ酸出現傾向を利用してタンパク質の認識・仕分け機構を考慮する際、膜貫通領域の境界(先頭および末端)をそれぞれ基準としたアラインメントが重要である。膜貫通領域境界では疎水性値が大きく変動するため、膜貫通領域中心を基準とした限られた区間において、平均疎水性値が最も変化した地点を求め、これを膜貫通領域境界と定めた。膜貫通領域情報に実験的確認のあるタンパク質で試行し、最適な平均疎水性値幅を決定したところ、高精度に膜貫通領域境界を予測することができた(論文投稿準備中)。

#### (7) ゴルジ内局在化機構解明のための膜貫通領域特徴抽出

ゴルジ膜に局在化するII型膜タンパク質のゴルジ内局在性(シスゴルジネットワーク・シスゴルジ・ミディアルゴルジ・トランスゴルジ・トランスゴルジネットワーク)に基づく膜貫通領域の性質比較を行った。その結果、膜貫通領域の平均疎水性値は細胞膜に近いゴルジ層ほど高くなる傾向にあることがわかった(実験的検証中)。

#### (8) 小胞体逆輸送タンパク質の膜貫通領域の役割

小胞体局在性タンパク質の細胞内局在経路による分類を行い、生合成された後に小胞体にとどまるタンパク質群と、いったんゴルジ体やそれ以降まで輸送された後に小胞体に逆輸送されるタンパク質群とで、配列の特徴を比較した。その結果、逆輸送グループには小胞体局在シグナルの存在があるほか、膜貫通領域はむしろゴルジ体局在タンパク質のアミノ酸出現傾向と類似しており、認識機構と局在経路との関係づけができた(実験的検証中)。

#### (9) 糖タンパク質の細胞内局在経路と糖鎖修飾の糖種との関係

糖タンパク質の細胞内局在性と、糖鎖修飾の糖種の関連性を調査したところ、糖種から局在経路を類推できることがわかった。また、糖転移酵素の細胞内局在性を調査し、細胞内局在経路と糖種のマッピングを行った。糖鎖修飾情報の増加に伴い、糖種マッピングのアップデートを行っている(Etchuya, *et al.*, Proceedings 2020, 2021, 2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai	4. 巻 1
2. 論文標題 Sugar Type Discrimination of Protein Sugar Modification based on Subcellular Localization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the 19th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2022)	6. 最初と最後の頁 89-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Etchuya, Motomichi Doi, Yuri Mukai	4. 巻 1
2. 論文標題 Sugar Type Discrimination of Protein Sugar Modification based on Subcellular Localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the Eighteenth International Conference on Flow Dynamics (ICFD2021)	6. 最初と最後の頁 442-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuri Mukai, Tatsuki Kikegawa, Makoto Ohta, Kenji Etchuya	4. 巻 1
2. 論文標題 The role of signal-anchor region of type II transmembrane protein in subcellular localization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the 20th International Symposium on Advanced Fluid Information	6. 最初と最後の頁 CRF-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai	4. 巻 1
2. 論文標題 Development of sugar type distribution by glycosylation based on protein subcellular localization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the 20th International Symposium on Advanced Fluid Information	6. 最初と最後の頁 CRF-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuri Mukai, Tatsuki Kikegawa, Yuriko Suda, Yuki Kobayashi, Makoto Ohta, Motomichi Doi, Kenji Etchuya	4. 巻 1
2. 論文標題 The Role of Signal-anchor Region of Type II Transmembrane Protein in Subcellular Localization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the 19th International Symposium on Advanced Fluid Information	6. 最初と最後の頁 CRF-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai	4. 巻 1
2. 論文標題 Development of Sugar Type Distribution by Glycosylation Based on Protein Subcellular Localization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the 19th International Symposium on Advanced Fluid Information	6. 最初と最後の頁 CRF-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kikegawa Tatsuki, Yamaguchi Takuya, Nambu Ryohei, Etchuya Kenji, Ikeda Masami, Mukai Yuri	4. 巻 82
2. 論文標題 Signal-anchor sequences are an essential factor for the Golgi-plasma membrane localization of type II membrane proteins	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1708 ~ 1714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2018.1484272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai
2. 発表標題 Sugar Type Discrimination of Protein Sugar Modification based on Subcellular Localization
3. 学会等名 Proceedings of the 19th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kenji Etchuya, Motomichi Doi, Yuri Mukai
2. 発表標題 Sugar Type Discrimination of Protein Sugar Modification based on Subcellular Localization
3. 学会等名 18th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺諒平, 古賀雄大, 向井有理
2. 発表標題 細胞内局在機構解明を目的とした膜タンパク質の膜貫通領域周辺の配列解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuri Mukai, Tatsuki Kikegawa, Makoto Ohta, Kenji Etchuya
2. 発表標題 The role of signal-anchor region of type II transmembrane protein in subcellular localization
3. 学会等名 The 20th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai
2. 発表標題 Development of sugar type distribution by glycosylation based on protein subcellular localization
3. 学会等名 The 20th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Yuri Mukai, Tatsuki Kikegawa, Yuriko Suda, Yuki Kobayashi, Makoto Ohta, Motomichi Doi, Kenji Etchuya
2. 発表標題	The Role of Signal-anchor Region of Type II Transmembrane Protein in Subcellular Localization
3. 学会等名	The 19th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Kenji Etchuya, Makoto Ohta, Yuri Mukai
2. 発表標題	Development of Sugar Type Distribution by Glycosylation Based on Protein Subcellular Localization
3. 学会等名	The 19th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Tatsuki Kikegawa, Yuri Mukai
2. 発表標題	Subcellular Localization Factors of Type II Membrane Proteins
3. 学会等名	Asian Biophysics Association Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Tatsuki Kikegawa, Yuri Mukai
2. 発表標題	Investigating the localization factors of type II transmembrane protein in secretory pathway
3. 学会等名	17th European Conference on Computational Biology (国際学会)
4. 発表年	2018年



1. 発表者名 Tatsuki Kikegawa, Yuri Mukai
2. 発表標題 The subcellular localization mechanisms of type II membrane proteins
3. 学会等名 The 43rd FEBS congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Etchuya, Tatsuki Kikegawa, Makoto Ohta, Yuri Mukai
2. 発表標題 The Role of Signal-Aanchor Region of Type II Transmembrane Protein in Subcellular Localization
3. 学会等名 The 18th International Symposium on Advanced Fluid Information (AFI-2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 分担執筆：越中谷 賢治，向井 有理，園山正史（津本浩平・浜窪隆雄 監修）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 NTS	5. 総ページ数 624
3. 書名 『膜タンパク質工学ハンドブック（第2編5節 膜タンパク質を対象としたアミノ酸配列解析とその応用）』	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	越中谷 賢治  (Etchuya Kenji)  (90806499)	明治大学・研究・知財戦略機構(生田)・研究推進員   (32682)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------