

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：12604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06539

研究課題名(和文) 出芽酵母カルシウムチャネルの制御サブユニットの翻訳開始コドン選択機構と膜輸送機構

研究課題名(英文) Codon selection mechanism and protein translocation mechanism of a calcium channel regulatory subunit in budding yeast

研究代表者

飯田 秀利 (IIDA, Hidetoshi)

東京学芸大学・教育学部・名誉教授

研究者番号：70124435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、出芽酵母のカルシウムチャネルの制御サブユニットMid1を用いて翻訳開始コドン選択機構と膜輸送機構を解明することを目的とする。Mid1は、そのN末端に小胞体(ER)内腔に入るためのシグナル配列(N-SP)をもつ。我々はMid1がN-SPだけでなくC末端にシグナルペプチド(C-SP)をもつことを示唆するデータを得た。そこで、本研究では、(1) C-SPのアミノ酸配列はどこからどこまでか、(2) どのような状況下でC-SPがはたらくのか、ということ調べた。その結果、(1)の方については最終的な解明に近づいた。(2)については未だ初期段階であり、今後の更なる研究が必要な状況である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞質で合成されたタンパク質が細胞膜上または細胞外に輸送されるには、教科書的には、そのタンパク質のN末端にシグナルペプチドと呼ばれる約20個のアミノ酸残基からなる領域(N-SP)が必要である。酵母のMid1タンパク質はそのN-SPが無くても細胞膜まで到達できることを、我々は発見した。さらに、その到達ができる理由はMid1のC末端に第2のシグナルペプチド(C-SP)と呼ぶべき領域があることも発見した。本研究によりその領域を厳密に決めることができ、どのような生理条件の時にC-SPが使われるのかを明らかにできれば、タンパク質の細胞内輸送の制御機構に全く新しい概念を打ち立てることができる。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study is to elucidate the mechanisms of translation-initiation-codon selection and membrane trafficking using Mid1, a regulatory subunit of a calcium channel in yeast. Mid1 has an N-terminal signal sequence (N-SP) to enter the endoplasmic reticulum lumen. We have obtained data suggesting that Mid1 has a C-terminal signal peptide (C-SP) as well as the N-SP. In this study, we investigated (1) the amino acid sequence of C-SP and (2) under what conditions the C-SP is used. In (1), we were close to the final clarification of it, while in (2), we are still in an early stage and need further research.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞内タンパク質輸送機構 Nグリコシル化 シグナルペプチド カルシウムチャネル 出芽酵母 小胞体

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究の開始前において、膜タンパク質が細胞質で合成された直後に小胞体に入るには、その膜タンパク質の N 末端に存在する約 20 個のアミノ酸残基からなる領域 (シグナルペプチドと呼ばれる; N-SP) が必要とされていた。しかし、我々は酵母のカルシウムチャネルのサブユニットである Mid1 タンパク質は、N-SP がなくても小胞体に入れることを発見した。更に、その後の研究から Mid1 の C 末端には第 2 のシグナルペプチド (C-SP) と呼べる領域があることを示唆した。

### 2. 研究の目的

本研究では、C-SP が Mid1 のどこにあるかを正確に決め、そのアミノ酸配列を決定することを第 1 の目的とした。更に、その C-SP がどのような生理条件の時に使われるのかを明らかにすることを第 2 の目的とした。

### 3. 研究の方法

Mid1 タンパク質は、548 個のアミノ酸残基からなる膜タンパク質である。このタンパク質は細胞膜に移行する前に、細胞質から小胞体の内腔に入り、そこで N グリコシル化を受ける。我々は、N 末端から 23 個のアミノ酸を欠失した Mid1(24-548)、つまり N-SP を欠失した Mid1、も正常に小胞体に入り N グリコシル化を受けることを見出している (Iida *et al.*, 2017)。この発見は、Mid1 には N 末端以外にもシグナルペプチドが存在することを示唆する。本研究で、Mid1 の N-SP と C 末端領域の両方を欠失した Mid1 は、N グリコシル化を受けないことを見出したので、この C 末端領域のどこに C-SP があるのかを調べた。そのために、まず Gas1 タンパク質断片 (G215; N グリコシル化モチーフを 5 つもつ) または人工のポリペプチド (QNV2; N グリコシル化モチーフを 2 つもつ) の N 末端側にウェスタンブロットティングで N グリコシル化を調べるための V5 タグと Cch1 タンパク質断片の融合物 (V5Cc) をつなぎ、N グリコシル化のレポーターとした。このレポーターの C 末端側に、様々な Mid1 の C 末端の断片をつないだ。それらの最終産物の基本構造は、V5CcG215-Mid1 C-fragment または V5CcQNV2-Mid1 C-fragment である。実験では、さまざまな Mid1 C-fragment が C-SP の役割をするかどうかを、ウェスタンブロットティングで調べた。使った抗体は抗 Cch1 抗体である。

### 4. 研究成果

上記の Mid1 C-fragment に関して、さまざまな Mid1 C-fragment を作製した。たとえば、Mid1(514-542)、Mid1(530-542)、Mid1(514-536)、Mid1(514-529)、Mid1(530-536) などである (ここで、それぞれの数値は N 末端の Met 残基を 1 とした時のアミノ酸残基の位置を示す)。これらのタンパク質断片を C 末端に付けたレポータータンパク質が小胞体に入って N グリコシル化を受けるか否かを、抗 Cch1 抗体を使ったウェスタンブロットティング法で調べた。その結果を図 1 に示した。

この図が示すように、Mid1(514-542)、Mid1(530-542)、Mid1(514-536)、Mid1(514-529) は N グリコシル化された。このことは、この領域に C-SP として機能するアミノ酸配列が存在することを示唆する。一方、Mid1(514-529)、Mid1(530-536) は単独では N グリコシル化されなかったため、この領域には単独で C-SP として機能するアミノ酸配列が存在しないことが示唆されたと考えることができる。

このような解析を、更に細分化した

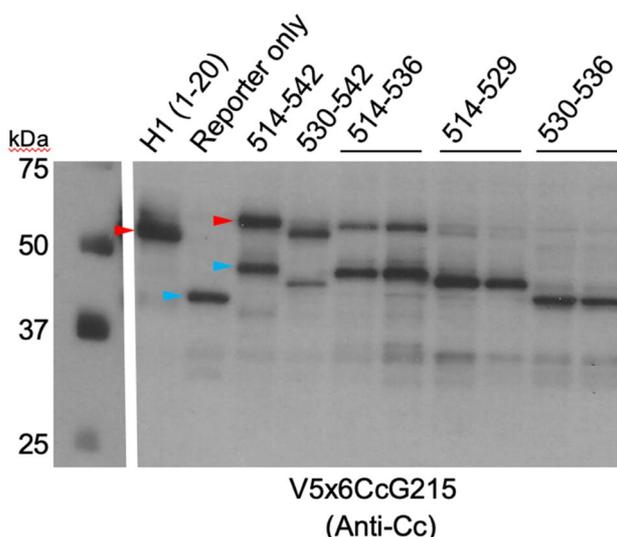


図1 Mid1のC末端の領域がシグナルペプチドとしてはたらくかを調べた実験の結果  
H1はN末端シグナルペプチド。赤色の矢尻はNグリコシル化したタンパク質、青色の矢尻はNグリコシル化しなかったタンパク質

Mid1 C-fragment を作製して N グリコシル化を調べた結果、C-SP の構造は当初考えていたよりも複雑であることが明らかになった。すなわち、Mid1C 末端を 514-529、530-536、および 537-542 の 3 つに分割した場合、それら単独では C-SP としてはたらくせず、2 つを組み合わせただけの場合にのみ C-SP としてはたらくことができた。具体的には、(514-529)+(530-536)、(514-529)+(537-542)、および (530-536) +(537-542) の組み合わせの場合にこれらの Fragment は C-SP としてはたらくたのである。

以上の結果は、Mid1 の C 末端の 514~542 の領域内にある 3 つのドメインが協調的にはたらくて C-SP としての役割をすると考えられる。この協調は 3 つ揃ったときが、一番効果的な C-SP となることが予想されるが、実験の結果、まさにその予想どおりの結果が得られた。

この研究成果は現在学会発表と論文発表の準備中である。

次に、この C-SP がどのような生理条件のときに使われるかを調べる研究は、上記の研究に多くの時間を取られたために、まだ十分になされていない。ただ、栄養飢餓の条件になると N-SP ではなく C-SP が使われることを示唆するデータを得ている。今後はこの研究に集中して初期の目的を達成したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Nakano, M., Furuichi, T., Sokabe, M., Iida, H., Yano, S., and Tatsumi, H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Entanglement of Arabidopsis seedlings to a mesh substrate under microgravity conditions in KIBO on the ISS.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants11070956	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 -
1. 著者名 Yoshimura, K., Iida, K., and Iida, H.	4. 巻 12
2. 論文標題 MCAs in Arabidopsis are Ca <sup>2+</sup> -permeable mechanosensitive channels inherently sensitive to membrane tension.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6074
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26363-z	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 -
1. 著者名 Nishii, K., Moeller, M., and Iida, H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Mix and match: Patchwork domain evolution of the land plant-specific Ca <sup>2+</sup> -permeable mechanosensitive channel MCA.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0249735
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0249735-e0249735	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 該当する
1. 著者名 Tojo, H., Nakamura, A., Ferjani, A., Kazama, Y., Abe, T., and Iida, H.	4. 巻 12
2. 論文標題 A method enabling comprehensive isolation of Arabidopsis mutants exhibiting unusual root mechanical behavior.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 646404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.646404.	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 -

1. 著者名 5.Okamoto, T., Takatani, S., Motose, H., Iida, H., and Takahashi, T.	4. 巻 40
2. 論文標題 The root growth reduction in response to mechanical stress involves ethylene-mediated microtubule reorganization and transmembrane receptor-mediated signal transduction in Arabidopsis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 575-582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-020-02653-6.	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 -

1. 著者名 Hayashi, T., Oishi K., Kimura, M., Iida, K., and Iida, H.	4. 巻 295
2. 論文標題 Highly conserved extracellular residues mediate interactions between pore-forming and regulatory subunits of the yeast Ca <sup>2+</sup> channel related to the animal VGCC/NALCN family	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13008-13022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014378.	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 -

1. 著者名 Hosomi, A., Iida, K., Cho, T., Iida, H., Kaneko, M., and Suzuki, T.	4. 巻 295
2. 論文標題 The ER-associated protease Ste24 prevents N-terminal signal peptide-independent translocation into the endoplasmic reticulum in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 10406-10419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012575	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 -

1. 著者名 Nakano, M., Furuichi, T., Sokabe, M., Iida, H., and Tatsumi H.	4. 巻 11
2. 論文標題 The gravistimulation-induced very slow Ca <sup>2+</sup> increase in Arabidopsis seedlings requires MCA1, a Ca <sup>2+</sup> -permeable mechanosensitive channel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-80733-z	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 -

1. 著者名 Okamoto, T., Takatani, S., Motose, H., Iida, H., and Takahashi, T.	4. 巻 40
2. 論文標題 The root growth reduction in response to mechanical stress involves ethylene-mediated microtubule reorganization and transmembrane receptor-mediated signal transduction in Arabidopsis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Reports	6. 最初と最後の頁 575-582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00299-020-02653-6	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 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 3件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hidetoshi Iida, Kazuko Iida, Kanae Nishii, Michael Moeller, and Kenjiro Yoshimura
2. 発表標題 MCAs are land plant-specific, inherently mechanosensitive Ca <sup>2+</sup> -permeable channels
3. 学会等名 10th International Plant Biomechanics Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田秀利
2. 発表標題 植物のメカノセンサー
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会ワークショップ「植物メカノバイオロジー：一細胞レベルからから個体レベルへ(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidetoshi Iida
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> -permeable mechanosensitive channels MCA1 and 2: their molecular nature and physiological roles
3. 学会等名 第86回日本植物学会大会JPRシンポジウム「Mechanical Forces in Plant Growth and Development」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田和子、飯田秀利
2. 発表標題 出芽酵母のカルシウムチャネル制御サブユニットMid1の膜輸送に重要な第2の領域
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iida, H.
2. 発表標題 Plant mechanosensitive channels MCA1 and MCA2: their structure, function, and roles
3. 学会等名 Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Furuichi, T., Nakano, M., Matsunami, S., Kato, A., Nakazawa, E., Nagano, Y., Fujita, H., Iida, H., and Tatsumi H.
2. 発表標題 Molecular mechanisms of plant growth and developments in the ISS, a closed environment under microgravity
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology and Space Life Science and Medicine, Nagoya (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iida, H., Hayashi, T., Oishi, K., Kimura, M., and Iida, K.
2. 発表標題 Identification of extracellular residues that anchor the interaction between the pore-forming subunit Cch1 and the essential regulatory subunit Mid1 of a yeast Ca <sup>2+</sup> channel
3. 学会等名 The 29th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, The Swedish Exhibition & Congress Centre, Gothenburg, Sweden (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田和子、飯田秀利
2. 発表標題 N末端シグナルペプチドを欠失した膜タンパク質のERへのトランスロケーション機構
3. 学会等名 第52回酵母遺伝学フォーラム、静岡市清水文化会館マリナート(清水市)、静岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田秀利、飯田和子、吉村建二郎
2. 発表標題 In vitroで合成・精製したシロイヌナズCa <sup>2+</sup> 透過性機械受容チャネルのイオン透過性
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会、東北大学川内北キャンパス(仙台市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩野 恵、末次憲之、西浜竜一、石田咲子、木村 緑、飯田和子、飯田秀利、永井健治、河内孝之
2. 発表標題 苔類ゼニゴケMCA1 オルソログの成長・生殖過程における機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会、東北大学川内北キャンパス(仙台市)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯田秀利、飯田和子、吉村建二郎
2. 発表標題 植物に固有の機械受容チャネルの構造と機械刺激受容機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 飯田秀利	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 441
3. 書名 植物の機械感覚 in 「生き物と音の辞典」(一社) 生物音響学会編	

〔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
研究協力者	飯田 和子  (IIDA Kazuko)		

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
---------	---------