

平成23年 6月 3日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770123

研究課題名（和文） 小胞体トランスロコンの機能解析

研究課題名（英文） Analysis of protein translocation and integration via the ER translocon

研究代表者

木田 祐一郎 (KIDA YUICHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：10423899

研究成果の概要（和文）：小胞体のタンパク質膜透過チャネル（トランスロコン）は、分泌タンパク質や細胞分泌経路の小器官内腔タンパク質の膜透過、および膜タンパク質の膜組み込みを行う。トランスロコンを通過するポリペプチド鎖の挙動解析から、(1)1つのトランスロコンが同時に2本の親水性ポリペプチド鎖を通す可能性、(2)疎水性配列や正電荷配列が示す膜透過停止挙動から予測される各配列のトランスロコンにおける認識ダイナミクス、(3)小胞体内腔での糖鎖付加による膜透過促進作用、について明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Secretory proteins, luminal, and membrane proteins on the secretory pathway are translocated across and integrated into the membrane via the protein-conducting channel (translocon) in the endoplasmic reticulum (ER). Our analyses of the ER translocon showed the follows. (1) One translocon can provide unexpectedly extensive hydrophilic pathway capable of at least two polypeptide chains. (2) 60-residue downstream positively charged residues retrieve a marginally hydrophobic segment from lumen into the membrane. (3) N-glycosylation at a specific position of a translocating chain facilitates its translocation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞小器官、タンパク質膜透過、膜タンパク質、小胞体、トランスロコン

1. 研究開始当初の背景

細胞および細胞小器官（オルガネラ）は、リン脂質とタンパク質からなる生体膜とい

うバリアによって囲まれており、それぞれ特有の成分を集積することで独自の役割を果たしている。脂質膜に埋め込まれた膜タンパク質は、膜内外の物質輸送や情報交換、膜に

おける物質の生合成・代謝など、生体膜における様々な反応を行い、また膜構造の形成に係わるなど、細胞・オルガネラの形成・維持に必須の役割を担っている。膜タンパク質も他のタンパク質と同様に細胞質のリボソームで合成されるが、そのまま自然に脂質膜内に入るのではなく、各オルガネラへと標的化された後、各々が有する膜タンパク質組み込み装置によって膜内へと組み込まれる。

小胞体、ゴルジ体、リソソーム、細胞膜など細胞分泌経路上のオルガネラには、細胞内の膜タンパク質の約7割が存在すると言われている。これらの大部分は、分泌経路の入口である小胞体において脂質膜へと組みこまれた後、小胞輸送によって目的のオルガネラへと輸送される。この膜タンパク質の組み込みが、分泌タンパク質等の膜透過と共通のタンパク質膜透過チャネル（トランスロコン）で行われることが明らかとなりつつある。チャネル本体である Sec61 複合体の古細菌および細菌ホモログの結晶構造（Van den Berg et al, Nature 2004; Tsukazaki et al, Nature 2008）では、膜に対して垂直な孔に加え側方に開きうるゲート様の構造も観察されており、膜貫通配列がトランスロコンから脂質環境へと横方向に分配されることが示唆されている。しかし、トランスロコンにおける膜貫通配列の認識、膜貫通方向の決定、脂質環境への横方向の輸送、などのメカニズムにはまだまだ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

我々は、トランスロコンの基質であるポリペプチド鎖が膜透過・組み込みにおいてトランスロコンおよびその周辺で示すダイナミクスの解析から、トランスロコンにおける配列の認識機構およびトランスロコン作動メカニズムの解明を目指してきた。本研究では我々がこれまで蓄積してきた膜透過・組み込み制御技術を基に複雑な膜組み込み中間状態を形成させ、各領域のトランスロコンでの配置状況を決定することより活動時トランスロコンの収容能力および会合状態に関する解析を行った。また、複数回膜貫通タンパク質の中には疎水性の低い膜貫通配列を持つものが存在するが、このような疎水性の低い配列のトランスロコンにおける膜透過・組み込み挙動についても解析した。これらに加えて、トランスロコンと相互作用するが機能が明確でない哺乳類 Sec62、Sec63 タンパク質の解析も行った。

3. 研究の方法

我々は、無細胞タンパク質合成系にイヌすい臓由来の粗面小胞体を添加した無細胞小胞体膜透過・組み込み系にて解析を行っている。小胞体でのタンパク質膜透過・組み込み

は翻訳に共役して起こることもあり、特定の反応を取り出して解析できる無細胞実験系は、各過程の詳細な解析に非常に有効である。この無細胞系ではタンパク質の膜透過・組み込みはもちろん、シグナル配列の切断や小胞体内腔でのアスパラギン結合型糖鎖付加などもほぼ再現される。また、生細胞では品質管理系により排除されるような改変膜タンパク質を合成できる、終止コドンの無い任意の長さの mRNA を翻訳することで合成中間体を形成できる、細胞質成分の添加・除去が容易にできる、なども無細胞系の強力なメリットである。

小胞体膜へと組みこまれたタンパク質については、任意の箇所のアスパラギン結合型糖鎖付加モチーフを導入しその領域の小胞体内腔への到達状況を糖鎖付加から判断する、細胞質側からのプロテアーゼ処理により保護される膜内および内腔側領域を特定する、などから膜内外の配置状況を決定できる。また膜透過・組み込み途中のポリペプチド鎖のトランスロコン内外の配置状況について、任意の部位に導入したシステイン残基 SH 基と化学架橋剤により架橋される分子の探索に加えて、親水的環境下でのみ起こる SH 基修飾反応を利用した配列環境の定量的評価系を本研究より立ち上げている。

4. 研究成果

(1) 複雑な膜組み込み中間状態が示すトランスロコンのポリペプチド鎖収容特性 (Kida et al, MBoC 2010)

アミノ末端側を膜透過させて膜貫通状態となるシグナルアンカー配列（小胞体標的化シグナルとして機能したのち切断除去されずに膜貫通配列としても機能する配列）について、ストレプトアビジンと高い親和性を示す配列（SBP タグ）をアミノ末端に融合し細胞質側のストレプトアビジンでトラップすることで膜透過停止状態を形成できる (Fig. 1; Kida et al, JCB 2007)。シグナルアンカー配列の組み込み状況を評価するために、配列にシステイン残基を導入し N-エチルマレイミドとの反応性から配列環境を調べたところ、この中間状態ではシグナルアンカー配列は親水的環境に存在しており、膜透過を再開させるとともに疎水的環境へと移行することが観察された (Fig. 1)。また、SBP タグ

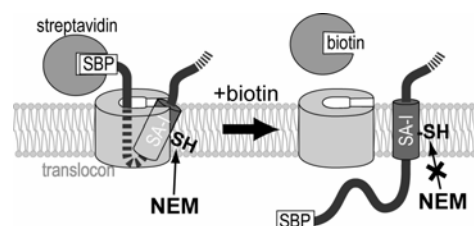


Fig. 1 シグナルアンカー配列の膜組み込みと内腔側ドメインの膜透過がカップルして起こる。

とシグナルアンカー配列との間隔を広げることで、アミノ末端がトラップされた状態でもシグナルアンカー直前の領域が小胞体内腔に到達するが、この時にはシグナルアンカー配列は既に疎水環境へと移行していた。これらの結果は、シグナルアンカー配列の膜組み込みとアミノ末端側ドメインの膜透過が密接にカップルすることを示している。膜透過の駆動作用とシグナルアンカー配列の配列特性との相関を示すデータも得られており (Kida et al, JBC 2009)、シグナルアンカー配列の膜組み込みが膜透過を直接駆動することが示唆される。

また、アミノ末端側を膜透過させるシグナルアンカー配列とカルボキシル末端側を膜透過させるシグナルアンカー配列をつなぎ、アミノ末端、カルボキシル末端とも細胞質側でトラップ

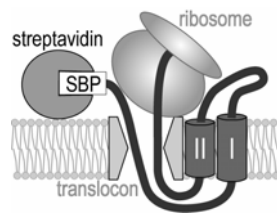


Fig. 2 2本の膜貫通配列 (円柱 I, II) 各々の内腔側ドメインの膜透過が途中停止した膜組み込み中間状態。

すると、Fig. 2 に示す複雑な膜組み込み中間状態を形成できる。膜貫通状態にある4本のポリペプチド鎖の各環境を調べたところ、シグナルアンカー配列 (=膜貫通配列) は両方も疎水的環境に存在する (但し Fig. 2 中の膜貫通配列 II は Sec61 α サブユニット近傍に存在) のに対し、透過途中で停止した親水性配列は2本ともチャネル本体である Sec61 α サブユニット近傍の親水的環境に位置していた。このことは、トランスロコンにおいて少なくともポリペプチド鎖2本分の親水的な孔が形成されうること示している。Sec61 α 単体ではポリペプチド鎖1本分の孔サイズであることが構造解析より示唆されており、活動時のトランスロコンは未知の構造変化や会合状態を伴って機能する可能性がある。

(2) 低疎水性配列のトランスロコンにおけるダイナミクス (Fujita, Kida et al, MBoC 2010; Yamagishi et al, JB 2011)

リボソームの翻訳と共役して膜透過するポリペプチド鎖上に膜貫通配列として十分な疎水性を有する配列が存在すると、トランスロコンで停止して脂質環境へと横方向に分配される。このようにして形成される膜貫通配列は膜透過停止配列と呼ばれ、多くの膜貫通配列はこの様式で膜に組み込まれる。その一方、比較的疎水性の低い配列であっても、その下流に正荷電アミノ酸残基を配置することで膜透過停止が促進されることも知られている。この低疎水性配列および正荷電残

基のトランスロコンを介した膜透過停止への作用機序を詳細に解析した。低疎水性配列 LA8 (ロイシンおよびアラニンが4個ずつの交互繰り返し配列) の上流または下流に6個のリジン残基からなる正電荷クラスター配列を距離を変えて挿入し膜透過停止効率を解析したところ、LA8 のみでは膜透過してしまうが、その下流に正電荷クラスターを挿入することで透過停止が促進された。この膜透過停止には LA8 の60 残基下流の正電荷クラスターが寄与できる一方、上流では効果が見られなかった。また、膜透過停止した分子を細胞質側からプロテアーゼ処理したところ、断片のサイズは正電荷クラスターの位置に関わらず一定であり、LA8 の直下から細胞質側に露出していることが示された。これらの結果より、低疎水性配列とかなり離れた下流の正電荷残基とが協調して膜透過停止に作用すること、また両配列間に距離がある場合でも低疎水性配列で膜を貫通し下流領域は細胞質に等しく露出することが分かった (Fig. 3 D)。

粗面小胞体ではリボソームとトランスロコンが結合し、合成途上のポリペプチド鎖は直接トランスロコンへと受け渡される。リボソームトンネルは tRNA 結合部位から出口まで約 40 残基長であり、低疎水性配列と正電荷クラスターが60 残基離れている場合には、低疎水性配列がトランスロコンに到達した時点ではまだ正電荷クラスターが翻訳されていないと考えられる (Fig. 3 A)。このような状況下でも低疎水性配列はトランスロコンで停留したままなのかどうか調べるため、LA8 の前後に糖鎖付加モチーフを導入した。その結果、正電荷クラスターが LA8 の40 残基以降に存在する場合に LA8 下流領域での糖鎖付加が観察された。従って、正電荷クラスターと離れている場合に LA8 は少なくとも一時的に小胞体内腔へと透過・露出すること

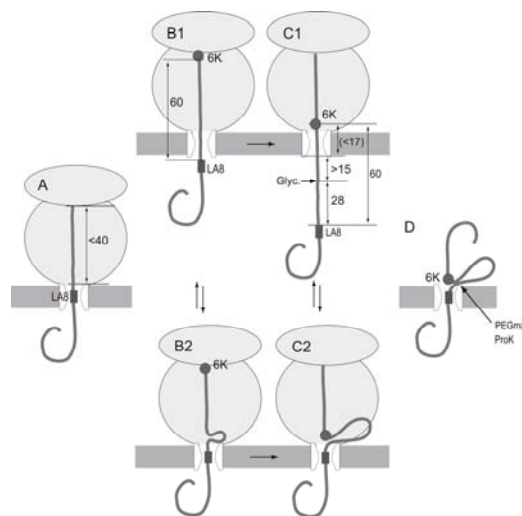


Fig. 3 下流の正電荷クラスター (6K) によって低疎水性配列 (LA8) の膜内配置が誘導される。

が示された (Fig. 3 B1 and C1)。また正電荷クラスターが下流になればなるほど、より後方の領域まで内腔に到達したことから、正電荷クラスターは疎水性配列とは独立に膜透過を阻止することが分かった。

以上の結果を総合して、低疎水性配列は単独では膜透過停止できず一過的に小胞体内腔へと到達するが、下流の正電荷クラスターによって膜内への逆戻りが誘導されることが示唆された。その際、正電荷クラスターは膜透過を阻止することで、低疎水性配列のブラウン運動等による揺らぎの範囲を限定し、トランスロコンへの逆行および相互作用を促進することが考えられた。これらの結果は、トランスロコンにおけるポリペプチド鎖のダイナミクスや各配列の識別機構に示唆を与える発見である。

また上述のように、低疎水性配列の小胞体内腔への到達はその前後に導入した糖鎖付加モチーフへの糖鎖付加により検出したが、低疎水性配列付近への糖鎖付加自体は膜透過停止を著しく阻害した。このことは、糖鎖が立体的障害となり低疎水性配列の膜内への逆戻りを阻害することを示唆している。タンパク質の膜透過及び膜透過停止が糖鎖付加によっても制御される可能性が示された。

(3) トランスロコン関連因子 Sec62、Sec63 の機能解析

Sec62、Sec63 は小胞体に局在する膜タンパク質であり、出芽酵母ではトランスロコンと複合体を形成し翻訳の完了した分泌タンパク質等の膜透過に働く。哺乳動物でもそれぞれのホモログが見つかっており、トランスロコン本体である Sec61 複合体やリボソームと相互作用することが報告されている。また、Sec63 が多発性肝嚢胞症の原因遺伝子の一つであること、数種のがん細胞で Sec62 の過剰発現または Sec63 の変異が観察されるなど、疾患との関連についても報告されている。しかし、これらの明確な機能は不明のままである。

哺乳動物細胞においても Sec62 と Sec63 は複合体として存在するが、相互作用に働くドメイン解析の結果、酵母ホモログと同様 Sec62 アミノ末端領域と Sec63 カルボキシル末端に存在する負荷電アミノ酸残基に富んだ領域 (いずれも細胞質側) とで相互作用することが分かった。また、293H 細胞にて FLAG タグを融合したヒト Sec62、Sec63 各々の安定発現株を作成し、各ミクロソーム画分を界面活性剤ジギトニンにて可溶化後、プルダウン法にて各タンパク質を回収し、共回収された数種類のタンパク質のマスマスペクトル解析を行った (大阪大学・蛋白質研究所、丸山浩樹准教授、西村紀教授との共同研究)。その結果、カルネキシン、BiP、リボフォリン I、

LRRC59 (p34)、VAPA、および PGRMC1 (いずれも小胞体タンパク質) が相互作用因子の候補として同定された。各タンパク質をコードした cDNA を調製し、Sec62 または Sec63 と培養細胞で共発現させ免疫沈降により回収した場合でも相互作用が確認されており、これら因子との機能相関が期待される。また、RNA 干渉により HeLa 細胞内の Sec62 または Sec63 の発現を低下させたところ、用いたモデル基質の膜透過及び膜組み込みへの影響は見られなかったが、小胞体の形態変化は引き起こされたことから、膜透過以外で小胞体機能に關与する可能性が示された。

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 4 件)

1. Yamagishi, M., Fujita, H., Morimoto, F., Kida, Y., and Sakaguchi, M.
A sugar chain at a specific position in the nascent polypeptide chain induces forward movement during translocation through the translocon. *J. Biochem.*, 149, 591-600. (2011) 査読有
2. Fujita, H., Kida, Y., Hagiwara, M., Morimoto, F., and Sakaguchi, M.
Positive charges of translocating polypeptide chain retrieve an upstream marginal hydrophobic segment from ER lumen to translocon. *Mol. Biol. Cell*, 21, 2045-2056. (2010) 査読有
3. Iwashita, S., Tsuchida, M., Tsukuda, M., Yamashita, Y., Emi, Y., Kida, Y., Komori, M., Kashiwayama, Y., Imanaka, T., and Sakaguchi, M.
Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70. *J. Biochem.*, 147, 581-590. (2010) 査読有
4. Kida, Y., Kume, C., Hirano, M., and Sakaguchi, M.
Environmental transition of signal-anchor sequences during membrane insertion via the endoplasmic reticulum translocon. *Mol. Biol. Cell*, 21, 418-429. (2010) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. 木田祐一郎、小胞体トランスロコン関連因子 Sec62・Sec63 の機能解析、BMB2010、2010 年 12 月 8 日、神戸ポートアイラン

- ド (兵庫県)
2. 矢吹隆明、ストレプトアビジン結合性タグ配列を利用した膜貫通配列の組み込み解析、BMB2010、2010年12月8日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 3. 藤田英伸、小胞体トランスロコンを介したタンパク質の膜透過は正電荷によって一時停止する、BMB2010、2010年12月8日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 4. 山岸麻里芙、小胞体トランスロコンにおける膜貫通セグメント形成のダイナミクス、BMB2010、2010年12月8日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 5. 本多裕輔、小胞体トランスロコンにおけるシグナル配列・シグナルペプチダーゼ・糖転移酵素の相対配置、BMB2010、2010年12月7日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 6. 木田祐一郎、弱疎水性配列と正荷電アミノ酸残基の協調作用による小胞体膜透過停止機構、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月18日、札幌コンベンションセンター (北海道)
 7. 藤田英伸、トランスロコンを通るポリペプチド鎖の動きは正荷電アミノ酸残基で減速する、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月16日、札幌コンベンションセンター (北海道)
 8. 本多佑輔、ペルオキシソーム膜タンパク質 PMP70 の N 末端モチーフは TM1 の ER 標的化を抑制する、第62回日本細胞生物学会大会、2010年5月19-20日、大阪国際会議場 (大阪府)
 9. 木田祐一郎、複雑な膜組み込み中間体を示す小胞体トランスロコンの柔軟性、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 10. 岩下昌平、ペルオキシソーム ABC 輸送体 PMP70 の N-末端に存在する小胞体標的化抑制モチーフ、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 11. 藤田英伸、小胞体トランスロコンの膜透過は正電荷アミノ酸残基のみによって停止する、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 12. 矢吹隆明、赤血球 Band3 タンパク質で見られる膜貫通配列の強制膜組み込み機構、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
 13. 山岸麻里芙、小胞体でのタンパク質膜透過における部位特異的な糖鎖のラチェット作用、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

14. Kida, Y.、Environments surrounding polypeptide chains translocating and integrating via ER translocon、Gordon Research Conference “Molecular Membrane Biology”、2009年7月6日、Proctor Academy (Andover, NH, USA)
15. 木田祐一郎、複雑な膜組み込み中間体を示す小胞体トランスロコンの柔軟性、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20日、熊本全日空ホテルニュースカイ (熊本県)
16. 阪口雅郎、小胞体トランスロコンにおいて膜貫通配列が駆動するポリペプチド鎖膜透過、第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20日、熊本全日空ホテルニュースカイ (熊本県)

[その他]

ホームページ等

<http://kyoin.u-hyogo.ac.jp/staff/sci/ykida/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木田 祐一郎 (KIDA YUICHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：10423899

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

阪口 雅郎 (SAKAGUCHI MASAO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：30205736