

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770151

研究課題名（和文） 哺乳類小胞体トランスロコンの機能解析

研究課題名（英文） Functional analyses of mammalian translocon of the ER

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）：(1) 膜組み込みには不十分な疎水性配列も小胞体トランスロコンにより識別されることが示唆された。現在トランスロコン本体、Sec61 チャネル内の疎水性認識部位の特定に向けて解析を進めている。(2) マルチスパン型膜タンパク質の新奇組み込みモードの検出に成功した。(3) 正荷電アミノ酸残基による小胞体膜透過減速の詳細について明らかにした。(4) コレステロール及びフォスファチジルセリンの小胞体膜透過・組み込みへの作用について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：(1) Marginally hydrophobic sequences, which cannot be integrated into the membrane, can be recognized by the ER translocon. We are now working toward identification of the recognition site of hydrophobic sequences in the Sec61 channel. (2) Novel integration mode of transmembrane sequences of a multi-spanning membrane protein is actually working in the membrane integration via the ER translocon. (3) The details of the translocation-deceleration effect by positively charged residues in the translocating polypeptide chain were determined. (4) The effects of cholesterol and phosphatidylserine for protein translocation and integration via the ER translocon were found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・機能生物化学

キーワード：タンパク質膜透過、シグナル配列、トランスロコン、小胞体、膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内で網目状に広がる小胞体は、細胞分泌経路の最上流に位置する細胞小器官（オルガネラ）である。そのうちリボソームが付着する粗面小胞体では、分泌タンパク質、および細胞膜を含む分泌系オルガネラに存在するタンパク質の生合成が行われている。膜上のリボソームは、トランスロコンと呼ばれるタンパク質膜透過チャネルに直接結合しており、新生ポリペプチド鎖がその伸長に

伴ってリボソームトンネルとトランスロコンを一続きに通過することで小胞体膜を透過する。また、このポリペプチド鎖中に疎水性アミノ酸残基からなる膜貫通配列が存在すると、トランスロコンで識別され、膜透過が停止するとともに脂質環境へと側方に輸出される。このように、小胞体ではトランスロコンを介したタンパク質膜透過・膜組み込みが翻訳に共役した形で行われている。

トランスロコンチャネル本体である真核

細胞 Sec61 複合体については、細菌や古細菌ホモログである SecY 複合体の X 線結晶構造が近年報告され、それを基にした SecY や出芽酵母 Sec61 の遺伝学的解析から、機能的に重要な領域も一部同定されてきている。しかし、トランスロコンチャネル開閉の制御、シグナル配列や膜貫通配列の認識および側方輸送機構、リボソームとの機能相関、などには現在でもまだまだ不明な点が多く残されている。

私は、トランスロコンを介したポリペプチド鎖、特に疎水性配列の挙動解析から、トランスロコンによる配列認識および輸送機構についてアプローチしてきた。本研究の開始以前には、トランスロコンを介した膜貫通配列の貫通方向（膜トポロジー）決定、並びに膜組み込みの挙動（Kida et al, JCB 2000; EMBO J 2005; JBC 2006; JBC 2009; Fujita, Kida et al, MBoC 2010）、およびトランスロコンのポリペプチド鎖収容能力（Kida et al, JCB 2007; MBoC 2010）に関する研究成果を報告している。

2. 研究の目的

本研究では以前の成果を基に、哺乳類トランスロコンの更なる機能解明を目指して、研究開始時に以下の課題を設定した。

(1) トランスロコンを介した膜貫通配列の組み込み挙動解析：膜貫通配列がトランスロコンで認識されて脂質環境へと側方輸送される一連の過程にはまだまだ不明な点が多い。我々の以前の解析から、脂質への移行には僅かに不十分な低疎水性配列も膜透過停止することが見出されており、すなわちトランスロコンに識別されうる可能性が示されていた。この低疎水性配列の膜透過・組み込み中間状態の詳細な解析から、トランスロコンを介した膜貫通配列の組み込み挙動、及びトランスロコンにおける疎水性配列の認識機構に迫る。

(2) ヒト Sec61 複合体の変異体解析：トランスロコン本体である Sec61 複合体については、細菌や出芽酵母では遺伝学的解析によって装置自体の機能解析が行われている。トランスロコンおよび関連因子の高等生物での機能の理解を目指して、遺伝子ノックアウトの容易なニワトリ DT40 細胞におけるノックアウト解析、およびヒトタンパク質による相補性解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では、無細胞タンパク質合成系にい

すずい臓由来の粗面小胞体を添加した、試験管内小胞体膜透過・組み込み再構成系にて解析を行っている。小胞体でのタンパク質膜透過・組み込みは翻訳と共役して起こる反応であり、膜透過・組み込み途中の観察には、翻訳中間状態を容易に形成できる無細胞系は非常に有効である。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、アスパラギン結合型糖鎖付加、といったタンパク質の小胞体でのプロセッシングも再現される。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・観察できる、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。

小胞体膜透過については、導入したアスパラギン結合型糖鎖付加モチーフへの小胞体内腔での糖鎖付加、または細胞質側に添加したプロテアーゼからの膜による保護状況などから判定できる。疎水性配列の膜組み込みについては、配列内に導入したシステイン残基への SH 修飾試薬（無水環境では反応できない）の反応効率により判断している。また、タンパク質中の任意箇所にシステイン残基を導入することで、化学架橋剤を利用した部位特異的架橋反応によるトランスロコンとの相互作用解析も行っている。

また、高等生物培養細胞による解析については、当初予定した DT40 細胞に加え、ヒト腎臓由来の 293H 細胞を使用している。現在は、293H 細胞でアフィニティタグを付加した Sec61 チャネルの安定発現株を樹立、この細胞よりマイクロソームを調製して解析に用いている。

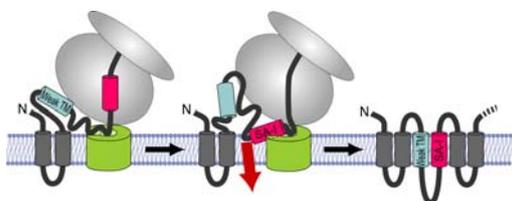
4. 研究成果

(1) トランスロコンによる膜貫通配列の識別について、疎水性度の異なる様々なモデル疎水性配列を設定し、それらの膜透過・組み込み挙動を無細胞実験系にて解析した。部位特異的架橋による疎水性配列と Sec61 チャネルとの相互作用解析の結果、膜組み込みには不十分な疎水性の比較的低い配列も Sec61 チャネルと相互作用しうること、この相互作用が膜透過中間状態においてより顕著に検出されることが分かった。低疎水性配列のトランスロコンでの一過性の停留は、マルチスパン膜タンパク質にしばしば見られる疎水性の低い膜貫通配列の膜組み込みに関与する可能性があり、更なる検討を行っている。

この相互作用に関わる Sec61 チャネル内部位の特定向けて、アフィニティタグ付きヒト Sec61 チャネルの安定発現細胞を樹立、この細胞由来のマイクロソームを用いた無細胞系による解析を進めている。現在までに、タグ付き Sec61 チャネルが内在性チャネル同様、

低疎水性配列と相互作用することを観察しており、機能的に発現していることは確認できている。今後は、変異型 Sec61 チャンネル発現ミクロソームを用いた相互作用解析を行い、疎水性配列認識部位の同定を目指す。

(2) マルチスパン型膜タンパク質、ヒト赤血球バンド3タンパク質の小胞体膜組み込みにおいて、膜組み込み能力の低い膜貫通配列(下図 weak TM)を、下流の膜貫通配列(下図 SA-I)が膜内へと引き込むという組み込み様式が提唱されていた。これら膜貫通配列間の内腔側ループ配列にストレプトアビジンと結合するタグ配列を導入したところ、その膜透過が細胞質側に添加したストレプトアビジンによって阻害された。このことから、この内腔側ループおよびその上流の膜貫通配列が細胞質側で一過的に停留した後膜透過・組み込みされるという膜組み込みモードの存在が実証された。(投稿中)



(3) 小胞体トランスロコン(タンパク質膜透過チャンネル)を介した膜タンパク質の構造形成において、膜貫通配列周辺の正荷電アミノ酸残基は貫通方向(膜トポロジー)を左右する主要因である。この正荷電残基をモデル分泌タンパク質に導入したところ、個数に応じて膜透過が減速・停止したことより、正荷電残基のみで透過阻害作用を発揮することを見出した。また、正荷電残基のクラスターが細胞質側表面で静電的相互作用により捕捉されることも分かった。これらの結果は、膜トポロジー決定の際の正荷電残基の作用機序の理解につながる成果である。(Fujita et al, JCS 2012)

(4) タンパク質の小胞体膜透過・組み込みへの膜脂質組成による影響を調べるため、 β -シクロデキストリンを利用してコレステロールを小胞体膜へと導入した。その結果、正荷電残基クラスターの膜透過が阻害された一方、疎水性配列については透過しやすくなった。トランスロコンを介した膜透過・組み込みがコレステロールにより影響されることが示された。(Yamamoto et al, Biochemistry 2012)

また、フォスファチジルセリン(PS)と特異的に結合するラクトアドヘリン C2 ドメインを発現、精製し、無細胞解析系に添加したところ、シグナル配列のトランスロコンへの

標的化、膜組み込み、及び内腔側ドメインの膜透過と、様々なステップにおいて阻害効果を示した。PSのトランスロコン機能への重要性が示された。(Yamamoto et al, BBRC 2013)

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5件)

以下の5件はいずれも査読有り。

- (1) Yamamoto, H., Kida, Y., and Sakaguchi, M. (2013)
Phosphatidylserine-binding protein lactadherin inhibits protein translocation across the ER membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 434, 620-626.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.131.
- (2) Takahara, M., Sakaue, H., Onishi, Y., Yamagishi, M., Kida, Y., and Sakaguchi, M. (2013)
Tail-extension following the termination codon is critical for release of the nascent chain from membrane-bound ribosomes in a reticulocyte lysate cell-free system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430, 567-572.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.112.
- (3) Yamamoto, H., Fujita, H., Kida, Y. and Sakaguchi, M. (2012)
Pleiotropic effects of membrane cholesterol on protein translocation across the ER membrane. *Biochemistry*, 51, 3596-3605.
DOI: 10.1021/bi2018915.
- (4) Fujita, H., Yamagishi, M., Kida, Y. and Sakaguchi, M. (2011)
Positive charges on the translocating polypeptide chain arrest movement through the translocon. *J. Cell Sci.*, 124, 4184-4193.
DOI: 10.1242/jcs.086850
- (5) Yamagishi, M., Fujita, H., Morimoto, F., Kida, Y. and Sakaguchi, M. (2011)
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.
DOI: 10.1093/jb/mvr011

〔学会発表〕(計 25 件)

- (1) 木田祐一郎 リボソーム-トランスロコン複合体における疎水性配列の識別機構 (第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡)
- (2) 藤田英伸 小胞体膜トランスロコンにおいて正電荷アミノ酸により引き起こされるポリペプチド鎖の逆方向への動き (第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡)
- (3) 阪上春花 膜タンパク質の小胞体標的化を抑制するアミノ末端モチーフの解析 (第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡)
- (4) 大西由希子 小胞体トランスロコンにおけるポリペプチド鎖膜透過の速度論: 少数の正電荷による膜透過減速効果 (第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡)
- (5) 姜 公秀 細胞内での小胞体トランスロコンにおけるタンパク質膜透過の一時停止を解析する (第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡)
- (6) Yuichiro Kida. Membrane Insertion of Transmembrane Sequences by Translocating Their Upstream Portions through the ER Translocon (EMBO conference series "The Physiology of the endoplasmic reticulum (ER): Function and Dysfunction" 2012 October 16, Melia Golf Vichy Catalan Hotel (Girona, Spain))
- (7) 木田祐一郎 小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質の構造形成 (第 12 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「in vivo 蛋白質科学: 構造形成と分解」, 2012 年 6 月 21 日, 名古屋国際会議場)
- (8) 大西由希子 リボソームは小胞体トランスロコンを介した膜貫通セグメントの形成を制御する (第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 6 月 21 日, 名古屋国際会議場)
- (9) 藤田英伸 小胞体トランスロコンを介したポリペプチド鎖の動き (第 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012 年 6 月 21 日, 名古屋国際会議場)
- (10) Haruka Sakaue. Analysis of N-terminal motif suppressing ER-targeting (Poster, 第 45 回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会, 2012 年 5 月 29 日, 神戸国際会議場・神戸商工会議所)
- (11) 姜公秀 T A 膜タンパク質の小胞体組み込み回避とミトコンドリア標的化機構 (第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日, パシフィコ横浜)
- (12) 木田祐一郎 小胞体トランスロコンにおける疎水性配列の認識・膜組み込み機構の解析 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 京都国際会館)
- (13) 山本等 小胞体トランスロコンのタンパク質膜透過に対するコレステロールの多面的影響 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会館)
- (14) 藤田英伸 小胞体膜トランスロコンにおけるポリペプチド鎖の動き解析 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 京都国際会館)
- (15) 山岸麻里芙 小胞体トランスロコンを介した膜貫通セグメント形成に対するリボソームの作用 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 京都国際会館)
- (16) 阪上春花 小胞体トランスロコンへの組み込みを抑制するアミノ末端モチーフの解析 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 京都国際会館)
- (17) 矢吹隆明 複雑な膜透過中間体が示す小胞体トランスロコンのポリペプチド鎖収容特性 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 24 日, 京都国際会館)
- (18) Hitoshi Yamamoto. Polypeptide movement in the protein conducting channel is modulated by cholesterol of the endoplasmic reticulum membrane (第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 16 日, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス)
- (19) Hidenobu Fujita. Effect of positive charges on the movement of polypeptide chain through the ER translocon (第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 18 日, 兵庫県立大学姫路書写キャンパス)
- (20) Masao Sakaguchi. ER-targeting Suppression by Short N-terminal Motif of Peroxisomal ABC Transporter, PMP70 (第 63 回日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27 日, 北海道大学)
- (21) 藤田英伸 小胞体トランスロコンを介

した膜タンパク質構造形成への正電荷
アミノ酸の寄与 (第11回日本蛋白質科学
学会年会, 2011年6月8日, ホテル阪
急エキスポパーク)

- (22) 木田祐一郎 小胞体トランスロコンを
介した膜貫通配列組み込み機構の解析
(第11回日本蛋白質科学学会年会, 2011
年6月8日, ホテル阪急エキスポパーク)
- (23) 山本等 タンパク質透過チャンネルで
のポリペプチドの動きは小胞体膜脂質
に影響される (第11回日本蛋白質科学
学会年会・ポスター, 2011年6月7日,
ホテル阪急エキスポパーク)
- (24) Yuichiro Kida. Marginal hydrophobic
sequence with downstream positive
charges is arrested at but not
integrated into the ER membrane.
(EMBO conference series "Protein
transport systems: structures,
mechanisms, and medical aspects"
2011 April 16-19, Hotel Flamingo
(Santa Margherita di Pula, Italy))
- (25) Hidenobu Fujita. Positive charges in
translocating polypeptide chain
regulate the movement through
translocon. (EMBO conference series
"Protein transport systems: structures,
mechanisms, and medical aspects"
2011 April 16-19, Hotel Flamingo
(Santa Margherita di Pula, Italy))

[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