

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570157

研究課題名(和文) 尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体への配向性膜挿入と膜構造制御に関する研究

研究課題名(英文) Study on the molecular mechanism underlying the posttranslational insertion of tail-anchored proteins into the endoplasmic reticulum membrane

研究代表者

山本 泰憲 (YAMAMOTO, YASUNORI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30467659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：尾部アンカー型膜タンパク質(テイルアンカ-型タンパク質とも呼ばれる)は様々な細胞内膜系に局在し、真核細胞の生命機能に必須の役割を担っている。尾部アンカー型膜タンパク質は小胞体へ膜挿入され、その後小胞輸送により適切な内膜系へと運ばれるが、膜挿入の分子機構については不明な点が多い。

本研究では、尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入装置の分子実体がCAML-WRB複合体であることを世界に先駆けて発見した。さらに、CAMLに結合する膜挿入制御タンパク質、小胞体の膜形態を制御する新しい膜変形タンパク質とその活性調節機構を明らかにした。このように本研究により膜挿入機構についての理解が大きく進んだ。

研究成果の概要(英文)：Tail-anchored proteins (TA proteins) are localized at various endomembrane compartments and play essential roles in cellular homeostasis. TA proteins are posttranslationally inserted into the endoplasmic reticulum (ER) membrane, followed by vesicular traffic to their final destinations. However, little is known about the molecular mechanism underlying the posttranslational membrane insertion.

In this study, we revealed that two ER membrane proteins, CAML and WRB, constituted the molecular machinery for the membrane insertion of TA proteins in mammalian cells. We identified the CAML-binding proteins responsible for regulating the membrane insertase activity of the CAML-WRB complex. We also identified a novel ER membrane-shaping protein and its binding protein responsible for regulating the membrane-shaping activity. Thus, this study uncovered the molecular identity of the membrane insertase for TA proteins and helped us understand the mechanism of the membrane protein insertion.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体 尾部アンカー型膜タンパク質 テイルアンカ-型タンパク質 膜挿入装置 CAML複合体 膜変形タンパク質

1. 研究開始当初の背景

尾部アンカー型膜タンパク質 (テイルアンカー型タンパク質とも呼ばれる) とは C 末端に膜貫通領域を持ち、N 末端が細胞質側に面している膜タンパク質の一群であり、様々な細胞内膜系に局在して、細胞内小胞輸送、細胞内シグナル伝達、オルガネラ形成、脂質代謝など、真核生物の生命機能に必須の役割を担っている。尾部アンカー型膜タンパク質は細胞質で遊離リボソームによる翻訳が完了した後、C 末膜貫通領域が膜透過装置トランスロコンを介さない経路で配向的に小胞体膜へ埋め込まれ、その後必要に応じて小胞輸送により適切な内膜系へと運ばれる。従って、小胞体膜への配向性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。

翻訳後に尾部アンカー型膜タンパク質を脂質膜へ埋め込むには、膜構造の高度な制御が必要であるが、本研究開始当初はその分子メカニズムについて不明な点が極めて多く、とりわけ小胞体膜に存在すると予想される非トランスロコン型膜挿入装置の分子実体も未解明のままであった。

2. 研究の目的

上述のような状況を踏まえ、本研究では尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入装置の分子実体を世界に先駆けて解明し、膜挿入装置の作動機構と膜構造の制御機構を解析することで、翻訳後に膜タンパク質を小胞体膜に配向挿入する原理を明らかにすることを目的とした。そして、得られた知見をもとに、タンパク質装置による膜構造制御についての新たな知見、新たな概念の創出を目指した。

3. 研究の方法

(1) 尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入装置の分子実体の解明

尾部アンカー型膜タンパク質は翻訳完了後、細胞質に存在する TRC40 ATPase に認識されて小胞体膜へリクルートされる。そこで、小胞体膜挿入装置の分子実体を明らかにするために、TRC40 をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー法により TRC40 に結合する小胞体膜タンパク質 (=膜挿入装置の構成分子) の精製、同定を行った。同定した小胞体膜タンパク質を安定に発現する HEK293 細胞を樹立し、その小胞体膜から免疫アフィニティークロマトグラフィー法により、膜挿入装置を構成するタンパク質複合体を網羅的に単離、同定し、膜挿入装置の分子実体を明らかにした。

(2) 尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入活性の解析

膜挿入活性は以下のような試験管内再構成アッセイを用いて解析した。HEK293 細胞を界面活性剤ジギトニンで処理して、細胞膜の

み選択的に溶解させたセミインタクト細胞を調製した。他方、C 末端に糖鎖修飾配列 (opsin タグ) を付加した尾部アンカー型膜タンパク質 Sec61 β (Sec61 β -opsin) の mRNA を合成し、これをウサギ網状赤血球抽出液を用いて *in vitro* 翻訳して、35S メチオニンラベルした Sec61 β -opsin を調製した。Sec61 β -opsin と TRC40 を含む反応液を HEK293 セミインタクト細胞と混合し、小胞体膜挿入反応を生じさせた。膜挿入は小胞体に挿入された際に起こる opsin タグへの糖鎖付加の有無で判定し、糖鎖付加による電気泳動移動度の違いをもとに放射線画像解析装置で膜挿入の程度を測定した。膜挿入装置構成分子やその結合分子を発現するプラスミドあるいは siRNA を準備し、これらをトランスフェクションした HEK293 細胞を用いて上記の試験管内再構成アッセイを行い、膜挿入に与える影響を解析した。

(3) 小胞体の膜構造形成機構の解明

小胞体の膜形態を調節する膜変形タンパク質の特徴として、ヘアピン様膜貫通領域を有していることが挙げられる。そこで、タンパク質データベースの中からヘアピン様膜貫通領域を持つ新規膜タンパク質を検索した。これを HeLa 細胞に過剰発現させて小胞体膜の形態に与える効果を免疫染色法で解析することで、小胞体膜制御タンパク質であることを確認した。膜タンパク質の組換えタンパク質を人工脂質膜リポソームに組み込み、膜形態に与える効果を電子顕微鏡で解析することで膜変形活性を評価した。新規膜変形タンパク質の結合タンパク質を精製、同定することで、小胞体の膜構造を制御する分子基盤を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入装置 CAML-WRB 複合体の発見

尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜ターゲティング因子 TRC40 をリガンドとするアフィニティークロマトグラフィー法により TRC40 に結合するタンパク質の精製、同定を行った。その結果、豚脳より TRC40 に結合する小胞体膜タンパク質として CAML を同定した。CAML を安定に発現する HEK293 細胞株を樹立し、免疫アフィニティークロマトグラフィー法により、CAML に結合するタンパク質を探索した結果、小胞体膜タンパク質 WRB を同定した。試験管内再構成アッセイを用いて膜挿入活性を解析した結果、CAML-WRB 複合体は、尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入に必須の因子であり、さらに CAML と WRB の競合的な TRC40 への結合が膜挿入に必要であることを明らかにした。以上の結果から、長年不明であった哺乳動物細胞の小胞体における尾部アンカー型膜タンパク質の非トランスロコン型膜挿入装置の分子実体が、CAML と WRB という 2 種の TRC40 受容体からなる分子

複合体 (CAML-WRB 複合体) であることを世界に先駆けて明らかにした (図1) (Yamamoto *et al. Molecular Cell* (2012); Yamamoto *et al. J. Biochem.* 印刷中)。

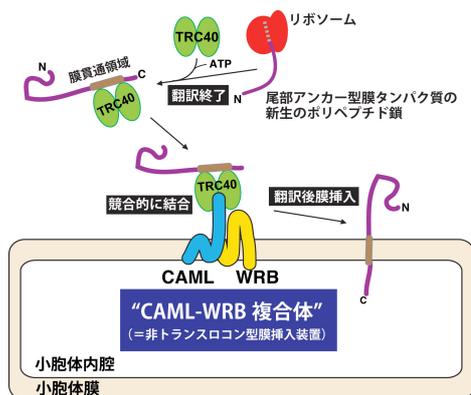


図1: 発見した尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入装置 CAML-WRB 複合体

(2) 小胞体膜挿入装置 CAML-WRB 複合体の制御機構の解明

CAML に結合する分子をさらに探索した結果、細胞膜受容体型タンパク質と新規小胞体膜タンパク質を同定した。これらの膜挿入反応における役割を試験管内再構成アッセイにより解析した結果、細胞膜受容体型タンパク質は CAML-WRB 複合体による膜挿入を負に制御し、小胞体膜タンパク質は正に制御していた。同定した細胞膜受容体型タンパク質は免疫系の細胞に特異的に発現しており、細胞膜に局在することで、免疫活性化シグナルを伝達する。そこで、細胞膜受容体型タンパク質の解析をさらに推し進めた。その結果、細胞膜受容体型タンパク質は小胞体で CAML-WRB 複合体と結合することで膜挿入を抑制するとともに、細胞膜への輸送が阻害されていた。このことから、免疫細胞において、尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入と細胞内シグナル伝達が CAML-WRB 複合体を介して機能的に結びついていることが示唆された。

(3) 小胞体の膜形態を制御する分子機構の解明

小胞体はチューブ構造とシート構造からなる網目状のネットワークを形成しており、このような独特の形態は膜タンパク質の膜挿入活性と密接に関係していると予想される。小胞体膜の形態形成にはヘアピン様膜貫通領域をもつ Reticulon ファミリーが重要な働きをしていることが知られているが、Reticulon だけで十分なのか、膜変形活性はどのように調節されているか、など不明な点が多い。私どもはヘアピン様膜貫通領域をもつ新たなタンパク質をデータベース解析で探索した結果、抗アポトーシス分子として知られていたタンパク質 Arl6IP1 が、意外なことにヘアピン様膜貫通領域活性を有していることが明らかになった。HeLa 細胞において Arl6IP1 は膜曲率の高いチューブ構造に局在

し、過剰発現により小胞体膜を強く収縮した。膜貫通領域のヘアピン構造を破壊した Arl6IP1 の変異体は小胞体膜の収縮活性を消失した。また、Arl6IP1 の組換えタンパク質は球形の人工脂質膜リボソームをチューブ状に変形した。以上の結果から、Arl6IP1 が新規の小胞体膜変形タンパク質であることが明らかとなった (Yamamoto *et al. Biochem. J.* (2014))。さらに Arl6IP1 に結合する新規膜タンパク質 TMEM33 を同定し、TMEM33 が Arl6IP1 と Reticulon に結合し、小胞体膜変形活性を負に調節していることを明らかにした (図2) (Urade *et al. Kobe J. Med. Sci.* (2014))。

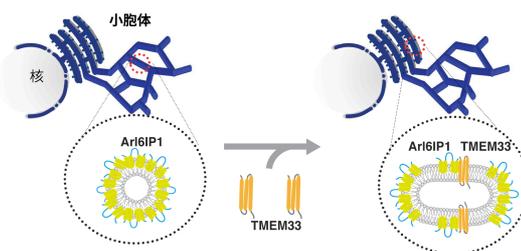


図2: Arl6IP1 と TMEM33 による小胞体の膜形態の制御機構

このように、本研究では、哺乳動物細胞における尾部アンカー型膜タンパク質の非トランスロコン型膜挿入装置の分子実体が CAML-WRB 複合体であることを世界に先駆けて発見した。さらに、免疫細胞活性化を担う細胞膜受容体型タンパク質が CAML に結合し、膜挿入装置の活性を制御することを明らかにした。このことから、尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入と免疫細胞活性化シグナル伝達の間 CAML を作用点とする未知の機能関係が存在していることが示唆された。今後、この機能関係の解明を推し進めることで、小胞体膜挿入を作用点とするシグナル伝達調節という新しい概念の提示に繋がると考えている。また、膜挿入制御によるシグナル伝達の破綻は免疫疾患と関係していることが予想され、医学的にも大変重要であると思われる。他方、CAML-WRB 複合体が、どのような分子機構で翻訳後に尾部アンカー型膜タンパク質を膜挿入するのかについては不明のままである。今後これらを明らかにするために、CAML-WRB 複合体を構造生物学的に解析する必要がある。

小胞体はチューブ構造とシート構造からなる網目状のネットワークを形成しているが、このような独特の膜形態と膜挿入制御との間の機能関係は不明である。本研究では、小胞体の膜形態を制御する分子機構として膜変形タンパク質 Arl6IP1 とその活性調節タンパク質 TMEM33 を明らかにした。他方、私どもの Arl6IP1 の論文発表とほぼ同時期に、別のグループから Arl6IP1 が遺伝性痲痺の原因遺伝子であると報告された。したが

って今後、本研究で明らかにした分子をツールにすることで、膜挿入制御の視点から小胞体の膜形態の生理的意味、遺伝性痙性対麻痺との関係を明らかにできる可能性が高いと考えている。

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)

① Yamamoto, Y. and Sakisaka, T.

The Emerging Role of Calcium-modulating Cyclophilin Ligand (CAML) in Posttranslational Insertion of Tail-anchored Proteins into the Endoplasmic Reticulum Membrane.

J. Biochem. 印刷中 (査読有)

DOI: 10.1093/jb/mvv035

② Urade, T., Yamamoto, Y., Zhang, X., Ku, Y., and Sakisaka, T.

Identification and Characterization of TMEM33 as a Reticulon-binding Protein.

Kobe J. Med. Sci., 60巻 3号, E57-E65, 2014 (査読有)

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/60/E57.pdf>

③ Hantan, D., Yamamoto, Y., and Sakisaka, T.
VAP-B Binds to Rab3GAP1 at the ER: Its Implication in Nuclear Envelope Formation through the ER-Golgi Intermediate Compartment.

Kobe J. Med. Sci., 60巻 3号, E48-E56, 2014 (査読有)

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/60/E48.pdf>

④ Yamamoto, Y., Yoshida A, Miyazaki N, Iwasaki K, and Sakisaka, T.

Arl6IP1 has the ability to shape the mammalian ER membrane in a reticulon-like fashion.

Biochem. J., 458巻 1号, 69-79, 2014 (査読有)

DOI: 10.1042/BJ20131186

⑤ Yamamoto, Y. and Sakisaka, T.

Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells.

Molecular Cell, 48巻 3号, 387-397, 2012 (査読有)

DOI: 10.1016/j.molcel.2012.08.028

[学会発表] (計3件)

① 山本 泰憲、匂坂 敏朗 小胞体の膜形態制御と翻訳後膜挿入の分子機構、第87回日本生化学会大会、2014.10.15 国立京都国際会館(京都府)

②張 霞、山本 泰憲、浦出剛史、匂坂 敏

朗 Reticulon結合タンパク質TMEM33の同定と性状解析、第36回日本分子生物学会年会、2013.12.3 神戸国際会議場(兵庫県)

③山本 泰憲、匂坂 敏朗 高等真核細胞における尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入装置の発見、第85回日本生化学会大会、2012.12.16 福岡国際会議場(福岡県)

[図書] (計1件)

① Yamamoto, Y. and Sakisaka, T.

Springer, Presynaptic Terminals, 2015, 365 (129-140)

[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・講師

研究者番号：30467659

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：該当なし

(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：80359843