

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：24506

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770153

研究課題名（和文） タンパク質小胞体膜透過ダイナミクスの一分子解析

研究課題名（英文） Single molecular analysis of protein translocation dynamics on the endoplasmic reticulum membrane.

研究代表者

山本 等（YAMAMOTO HITOSHI）

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・研究員

研究者番号：40419007

研究成果の概要（和文）：

タンパク質が細胞内の適切な場所に輸送されて機能するためには、タンパク質の膜透過や膜組み込みが必須である。これらの過程は真核細胞内では小胞体膜で進行する。本研究では、タンパク質膜透過ダイナミクスの一分子レベルでの解析を目指した。ミクロソームを共存させた無細胞合成系を用いたサプレッサー tRNA 法により、蛍光色素標識したタンパク質膜透過中間体を作成した。全反射型蛍光顕微鏡による解析から膜透過中間体由来の蛍光および消光を観測することができた。しかしながら、高いバックグラウンド光、ラベル色素の低い蛍光強度および蛍光寿命による低 S/N 比が明らかとなり、これらの改善が課題として残った。

研究成果の概要（英文）：

Protein translocation and integration are essential processes by which proteins are transported to their proper destinations. These processes proceed on the endoplasmic reticulum membrane in eukaryotic cells. In this study, we aimed at single molecule analysis of protein translocation dynamics. Protein translocation intermediate were synthesized with using cell free protein synthesis system and microsome, and labeled with fluorescent dye by suppressor-tRNA methods. The fluorescence and quenching were successfully observed by using total internal reflection fluorescence microscopy. However, due to the low S/N ratio caused by high background light, low fluorescence intensity and short life time, it was found that effective fluorescence intensity change was hardly observed. Thus, improving the S/N ratio remained to be as future work.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測・操作・膜タンパク質・膜透過

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はそれぞれ固有の場所に輸送

されて初めて機能する。細胞質タンパク質は合成後も細胞質に留まる一方、膜タンパク質の膜貫通疎水性セグメントは生体膜に組み込まれ、分泌タンパク質は細胞内膜系を透過して最終的には細胞外に分泌される。真核細胞内ではタンパク質の膜透過や膜組み込みは小胞体膜で進行する。合成に伴ってリボソームから露出した新生ポリペプチド鎖のうちシグナル配列を持つものは、シグナル認識粒子に認識され、小胞体タンパク質透過チャンネルへ輸送される。その後ポリペプチド鎖は透過チャンネルの孔へ侵入し、チャンネル内に進入したアミノ酸配列の性質によって二つの経路に分かれる。進入部が親水性アミノ酸からなる場合はチャンネル孔から小胞体内腔側へ通過し、一方、疎水性アミノ酸からなる膜貫通配列の場合はタンパク質透過チャンネルを通過せずに側方移動して小胞体膜へと組み込まれる。このとき、(1)膜貫通配列の配向は隣接正電荷アミノ酸の存在位置(膜貫通配列のN末端側かC末端側か)によって決定され、(2)膜透過の駆動力は膜貫通配列の小胞体膜への分配によって起こり、その大きさは膜貫通配列の疎水性度に比例することが分かっている。複数膜貫通配列をもつ膜タンパク質ではこのプロセスが複数回繰り返され、膜貫通領域のトポロジーが形成されると考えられている。

モデルタンパク質を用いたこれまでの研究から、正電荷アミノ酸配列が単独で膜透過を抑制し、その時の透過速度は正電荷アミノ酸数に反比例すること、さらに、それぞれ単独では膜透過抑制を検出できない疎水性度の低い膜貫通配列や少数の正電荷アミノ酸配列も、両者が組み合わさることで膜透過を抑制することが明らかになってきた。このことから、生体内に存在する膜タンパク質で見られるような、疎水性度の低い膜貫通配列や少数の正電荷アミノ酸配列にも同様のメカニズムが存在することが予想されていた。

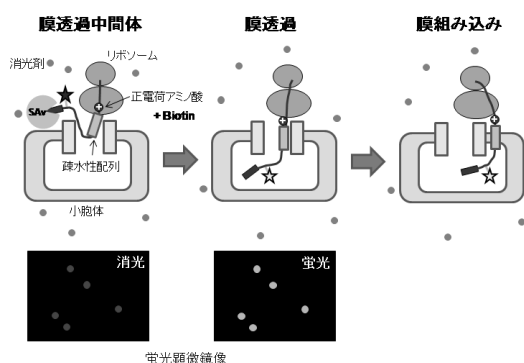
しかしながら、これまで膜透過のダイナミクスは、導入した糖鎖付加配列が膜透過後に小胞体内腔で糖鎖修飾を受けることによる分子量シフトを電気泳動的に検出することで解析されてきた。この方法では、時間分解能が分のオーダーであること、また多数分子の膜透過前後の2状態変化の平均値のみが観測されることから、①正電荷アミノ酸一個が膜透過に与える影響、②膜透過速度の分布、③膜透過の中間状態、④協同性の有無、⑤温度依存性、等の膜透過過程の詳細な解析ができなかった。そこで、低疎水性配列および少数正電荷アミノ酸が膜透過ダイナミクスに与える影響より詳細に解析するため、膜透過中間体の膜透過過程を秒以下の時間分解能でリアルタイムに一分子レベルで観測する方法が望まれていた。

2. 研究の目的

本研究計画では、(1)タンパク質の小胞体膜透過を全反射型蛍光顕微鏡を用いて可視化・一分子レベルで計測し、(2)そのダイナミクスをリアルタイムかつ定量的に明らかにすること、さらに(3)膜貫通配列および近傍の正電荷アミノ酸数を系統的に改変したモデルタンパク質の解析により、これらの配列と膜透過ダイナミクスの関係を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

マウス由来 SBP-SynaptotagminII (SBP-SytII) をモデルタンパク質に用いた。これは、N末端にSBP (ストレプトアビジン結合ペプチドタグ) 配列と末端ら70残基後方にシグナルアンカー配列を一つ持つ全長200残基のタンパク質である。ストレプトアビジンで、N末端を細胞質側に保持し、ビオチンを加えることでN末端の膜透過を開始することができる。また、C末端側はストップコドンが付加していないので、合成終了後もリボソームは解離せずにC末端が細胞質側に保持される(図参照)。このSBP-SytIIにアンバーコドンを導入し、イヌ臓由来ミクロソームを共存させた小麦胚芽無細胞合成系でタンパク質膜透過中間体を作成した。その際に、蛍光色素 HiLyte Fluor 488 を結合させたフェニルアラニル-tRNA を反応液に添加して、サプレッサー-tRNA 法により蛍光色素を部位特異的に導入した。次いで、ショ糖密度勾配遠心法により精製した。標識の程度は膜透過中間体由来の蛍光を蛍光イメージスキャナで確認した。蛍光の一分子計測には、低バックグラウンドによる高シグナル/ノイズ比が期待される、全反射型蛍光顕微鏡を用いた。膜透過過程は、蛍光標識膜透過中間体を消光剤存在下、ビオチン添加によりN末端の膜透過開始させることで、導入した蛍光分子が消光剤から隔離され、蛍光強度の増大として観測されることが予想される(図参照)。



膜透過に伴う蛍光強度変化の観測法

4. 研究成果

(1) 全反射型蛍光顕微鏡による観察条件の検討。まず、小麦胚芽抽出物無細胞合成系でサプレッサー tRNA 法により、蛍光色素 HiLyte Fluor 488 で標識したイヌ臍臓ミクロソーム膜透過中間体を合成し、ショ糖密度勾配遠心法で精製した。次いで、これを段階希釈してスライドガラス上に塗布し、全反射型蛍光顕微鏡で観察した。その結果、タンパク質膜透過中間体に付加した蛍光色素に由来する蛍光を顕微鏡視野内で個別の光点として観測することが出来た。さらに消光剤 DABCYL の添加によってその蛍光を消光することができた。一方、主にスライドガラスおよび消光剤に由来するバックグラウンド光、およびラベル色素の低い蛍光強度のため、顕微鏡視野内での中間体の位置特定およびその蛍光の識別に時間を要することが分かった。

(2) 膜透過に伴う蛍光強度変化の観察。ストレプトアビジンにより膜透過を停止させた状態からビオチン添加によって膜透過を開始させ、膜透過中間体の標識蛍光色素が消光剤から隔離されることによって期待される蛍光強度の増加を、全反射型蛍光顕微鏡で観察した。スライドガラス上に固定した膜透過中間体にビオチンを添加し、その後の蛍光強度の時間変化をビデオカメラで記録した。しかしながら、蛍光色素の退色速度が速く、蛍光強度の有意な増加を観測することはできなかった。

(3) 顕微鏡視野内での膜透過中間体の位置特定を目的としたミクロソームの蛍光標識。顕微鏡視野内のバックグラウンド光から膜透過中間体を容易に識別するために、ミクロソーム内腔へ蛍光タンパク質の導入を行った。膜透過中間体を合成する際に、蛍光タンパク質の mRNA を共存させて、無細胞合成を行った。その結果、ミクロソーム内腔での蛍光タンパク質の発現を電気泳動的に確認することが出来た。

無細胞合成系を用いて膜透過中間体を合成し、サプレッサー tRNA 法により蛍光標識するために、蛍光顕微鏡で観察可能な量の蛍光標識膜透過中間体が得られるかが、計画当初から懸念されていたが、実際に観察可能な量の膜透過中間体が合成できたこと、および個々の中間体に由来する蛍光を全反射型蛍光顕微鏡の視野中で個別の光点として観察できた意義は大きい。一方、解析に耐えうる蛍光強度変化を得るためのシグナル/ノイズ比の改善には至らず、研究期間内にタンパク質膜透過ダイナミクスおよび疎水性配列や正電荷アミノ酸数との定量的解析に踏み込むことが出来なかった。今後、①高い蛍光強度

および長寿命の蛍光色素、②低バックグラウンド光を持つ消光剤、③低バックグラウンド光のスライドガラスおよびカバーガラスまたはそれらの処理法、④膜透過中間体量、⑤照射光の強度や波長、⑥バッファー組成、等の検討によるシグナル/ノイズ比の改善が課題として残った。

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1件)

Yamamoto, H., Fujita, H., Kida, Y. and Sakaguchi, M. Pleiotropic Effects of Membrane Cholesterol upon Translocation of Protein across the Endoplasmic Reticulum Membrane. (2012) *Biochemistry*, 51, 3596-3605, DOI:10.1021/bi2018915 (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

① 山本 等、藤田英伸、木田祐一郎、阪口雅郎

「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回日本蛋白質科学会年会(2011年6月7-9日)ホテル阪急エキスポパーク(大阪府)

② Yamamoto, H., Fujita, H., Kida, Y. and Sakaguchi, M.

「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16-18日)兵庫県立大学姫路書写キャンパス(兵庫県)

③ 山本 等、藤田英伸、木田祐一郎、阪口雅郎

「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21-24日)国立京都国際会館(京都府)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 等 (YAMAMOTO HITOSHI)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・
研究員
研究者番号：40419007

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし