

令和元年6月3日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14730

研究課題名(和文)膜タンパク質小胞体回避モチーフ作用因子の機能解明への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to elucidation of the function of ER-targeting suppressing factor for membrane protein

研究代表者

阪口 雅郎 (Sakaguchi, Masao)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：30205736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞を構成する様々な生体膜には多様な内在性膜タンパク質が存在する。真核細胞では、内在性膜タンパク質はその疎水性によって、小胞体に標的化されるのがデフォルトである。しかし、疎水性を持ちながら小胞体に標的化されない膜タンパク質が存在する。ここではそのための、膜タンパク質小胞体回避の分子機構を追求した。タンパク質N末端ミリスチル化酵素が、ペルオキシソーム膜タンパク質ABCD3の小胞体標的化を抑制する因子本体であることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核細胞の中では、多種の膜タンパク質がそれぞれ独自の機能する領域で役割を發揮することが必要である。膜タンパク質のその疎水性特性から、小胞体に向かう巧妙な機構によって大半が小胞体に配置される。しかし、小胞体からゴルジ体を経て細胞膜やリソソームに至る膜系以外の細胞小器官の膜タンパク質は、この小胞体標的化機構を回避する。この回避機構に関わる因子を明らかにすることができた。それは、タンパク質の先頭N末端に脂肪酸であるミリスチル基を付加する酵素であった。

研究成果の概要(英文)：A variety of integral membrane proteins exist in various biological membranes constituting cells. In eukaryotic cells, by default the integral membrane protein is targeted to the endoplasmic reticulum. However, there are membrane proteins that have hydrophobic properties but are not targeted to the endoplasmic reticulum. Here, we sought the molecular mechanism for suppressing the targeting of membrane proteins to the endoplasmic reticulum membrane. We elucidated that the protein N-terminal myristoylation enzyme is the factor that suppresses endoplasmic reticulum targeting of the peroxisomal membrane protein ABCD3 isoform.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：膜タンパク質 細胞小器官

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内には、様々な膜オルガネラが存在している。それぞれの膜系に、特異的な膜タンパク質が局在化して独自の機能を発揮し、細胞の生命活動が維持されている。我々は、このような膜タンパク質の細胞内局在化の分子機構の解明を目指している。本研究では、典型的な多数回膜貫通タンパク質である、ATP 結合カセットを有する輸送タンパク質 (ABC 輸送体) の「細胞内配達機構」に焦点をあてた。ABC 輸送体は、単一生物種に多くの類似タンパク質が存在する、いわゆる遺伝子ファミリーを構成する。これらが、それぞれ特定の細胞内オルガネラに配置され、独自の機能を発揮する。たとえば、B 群アイソフォームはミトコンドリア、D 群はペルオキシソーム、C1 は細胞膜側基底部分、C2 は細胞膜頂端部分に局在化する。これらの ABC 輸送体は、それぞれの部位で、様々な物質輸送に必須の役割を担い、細胞や臓器の老廃物排出、必要な物質の搬入、などを担う。また、がん細胞においては、抗がん剤を排出することによって、がん細胞の抗がん剤耐性の原因になる。このようなことから、基礎研究にとどまらず、医学・薬学・農学の多方面で活発に研究されている。これまで、我々は、ペルオキシソームに存在する ABC 輸送体 (ファミリー D 群のアイソフォーム) が、他のオルガネラ膜に存在する ABC 輸送体アイソフォームと同等の疎水性をもつ膜貫通セグメントを構成要素として持つにもかかわらず、シグナル認識粒子 (SRP) などに代表される、疎水性配列を認識し小胞体へ標的化する分子機構を免れ、直接ペルオキシソームに到達できる機能を研究してきた。その過程で、ABCD3 アイソフォーム (ABCD3、別名 PMP70) の N 末端の 12 残基程度のセグメント (N12) が、その後方の疎水配列の小胞体標的化を抑制すること、その作用には特異な配列が要求されること、N12 には分子量 50 kDa のタンパク質因子が結合し作用することなどを明らかにしてきた。その研究の延長として、N12 に作用する因子の実態解明が挑戦的な課題となった。

2. 研究の目的

本研究課題では、ABC 輸送体ファミリーのなかで、ペルオキシソームに局在する ABC 輸送体 (D3 アイソフォーム) の小胞体標的化抑制 (ETS) 機構に焦点をあてた。これまでに、「膜タンパク質の小胞体回避 (ETS) 配列」という概念を提案し、D3 アイソフォームの N 末端 (N12) に、その後方の第一膜貫通配列の小胞体標的化を抑制する作用のあることを発見し、その作用には特異配列が必要なこと、N12 は無細胞系のみならず生細胞系でも作用できること、他の無関係なシグナル配列にも作用して小胞体標的化を抑制することなどを明らかにしていた。本研究では、N12 モチーフ配列に作用する因子の候補として同定された Nmt1 の作用機能解明を目的とした。そのために、(1) HeLa 再構成タンパク質合成系を用いて小胞体回避モチーフ (N12) の ETS 機能の解析、(2) 小胞体回避モチーフ結合タンパク質としての Nmt1 の機能解析、(3) Nmt1 発現ノックダウンの効果解析及びレスキュー実験による生理機能の確定、を目的として設定した。

3. 研究の方法

本研究では、細胞質のリボソームで合成される ABC 輸送体 D3 アイソフォームをペルオキシソームへ正確に送り込むために必要な小胞体回避機構に焦点をあて、下記を実施した。

(1) HeLa 再構成タンパク質合成系を用いた小胞体回避モチーフ (N12) の ETS 機能の解析：ウサギ網状赤血球溶血液 (RL) 系では N12 は小胞体標的化抑制を示すことが明らかにされた。この作用に、どのような因子の寄与があるかを調べる目的で、兵庫県立大学工学研究科今高研究室で構築されている、HeLa 細胞からの精製因子で再構成されたタンパク質合成系 (HeLa 再構成系) を用いて、これにイヌ臍臓から高度に精製された膜透過活性の高い粗面ミクロソーム膜小胞を添加し、ETS 作用解析を行った。小胞体膜への組み込み程度を小胞体によるアスパラギン結合糖鎖の付加によって評価した。ETS 効果がある場合には、糖鎖付加が抑制されると予想された。また、未知因子が関与するならば、この系では ETS 作用が見られないと予想された。

(2) 小胞体回避モチーフ結合タンパク質としての Nmt1 の機能解析：ETS 作用因子の有力候補として同定されていた Nmt1 について、N12 配列との結合解析を行った。大腸菌で発現し精製したもの、ウサギ網状赤血球溶血液を用いて発現させたもので、N12-モチーフ GST 融合タンパク質との結合実験を実施した。アフィニティーブルダウン画分への Nmt1 の回収をウエスタンブロットングで検出した。

(3) Nmt1 発現ノックダウンの効果解析及びレスキュー実験：N 末端ミリスチル化酵素 Nmt には 2 つのアイソフォームが知られている。それぞれの抗体および複数種の siRNA を入手し、ノックダウン実験を実施した。ノックダウン効果は、D3 のアミノ末端領域を含むレポータードメイン (PLg) の小胞体標的化回避状況で調べた。小胞体回避されている場合には、PLg ドメインへの糖鎖付加が減少すると予想された。PL ドメインの安定的検出のために、プロテアソーム阻害剤 MG132 添加条件で培養を行い、PL ドメインの検出はウエスタンブロットングにより行った。

4. 研究成果

(1) ETS 作用の HeLa 再構成系での解析：D3 分子の第一膜結合部分を含む部分およびその配列変異体の小胞体標的化を、イヌ臍臓精製粗面小胞体を添加した HeLa 再構成系で調べた。その結果、N12 (ETS) モチーフは、網状赤血球溶血液のタンパク質合成系とイヌ臍臓の粗面小胞体を組み合わせた無細胞系では、ETS 作用を発揮することが確認された。一方、HeLa 細胞・精製因子再

構成無細胞タンパク質合成系では ETS 作用は認められなかった。この ETS モチーフの作用にはそれに作用する因子が作用しており、HeLa 再構成系にはその因子が含まれないと結論された。

(2)小胞体回避モチーフ結合タンパク質としての Nmt1 の機能

化学架橋反応を指標に、各種分画手法を駆使して、結合因子の精製に成功し、質量分析で同定された複数の候補因子を大腸菌にて発現し、組み換え体を使って、N12-配列への結合を確認した。そのうちの Nmt1 タンパク質は N12 モチーフを融合した GST タンパク質に有意に結合することもプルダウン実験によって確認された。また、S5A 変異を持つ N12 では結合性が消失していることも確認された。

(3)siRNA による発現抑制実験：

HeLa 細胞で Nmt1 をノックダウンする条件を検討した。多種類の siRNA 候補を入手し、そのノックダウン効果をウエスタンブロットングによって調べた。HeLa 細胞内には、Nmt のファミリーとして 1 と 2 のアイソフォームが発現していることを知った。アイソフォーム 2 は非常に少なくアイソフォーム 1 が 5 倍以上存在した。その状況でノックダウン効果を見ると、Nmt1 ノックダウンによって Nmt1 タンパク質が顕著に減少することがわかった。この条件で、ETS 作用も顕著に減弱することが確認された。一方、Nmt2 ノックダウンによっては ETS 作用はほとんど影響を受けなかった。これは、アイソフォーム 2 は減弱するものの、アイソフォーム 1 が ETS 作用を発揮するためと考えられた。さらに、ノックダウン用の siRNA の作用を受けない Nmt1cDNA を構築し、レスキュー実験を実施した。その結果、ノックダウンによって減弱していた ETS 作用の回復が明確に認められた。ここで、Nmt1 が N12 の ETS モチーフに作用して小胞体標的化抑制作用を発揮していることが証明された。

(4)ノックダウン後のレスキュー実験による Nmt1 の構造機能相関の解析

レスキュー実験系が設定できたことで、様々な Nmt1 変異体の ETS 機能レスキュー作用が評価できることとなった。Nmt1 については、結晶構造が明らかにされ、基質であるミリスチル-CoA 結合部位、基質ペプチド結合部位、ミリスチル基転移反応触媒部位などの作用部位が同定されている。それぞれに重要なアミノ酸残基の変異効果を調べるために、一連の変異体を構築した。ノックダウン後、変異体発現プラスミドをその細胞に導入し、効果を調べた。その結果、基質ペプチド結合部位の変位導入によって ETS 作用が減弱することが見出され、N12 モチーフが直接 Nmt1 に結合することが作用に必要であると結論された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Kida, Y., Sakaguchi, M. (2018)

Interaction mapping of the Sec61 translocon identifies two Sec61 α regions interacting with hydrophobic segments in translocating chains.
J. Biol. Chem., 293 (44), 17050-17060 (doi: 10.1074/jbc.RA118.003219)

(2) Kida, Y., Ishihara, Y., Fujita, H., Onishi, Y. and Sakaguchi, M. (2016)

Stability and flexibility of marginally hydrophobic segments stalling at the endoplasmic reticulum translocon
Mol. Biol. Cell, 27, 930-940 (DOI: 10.1091/mbc.E15-09-0672)

(3) Sakaue, H., Iwashita, S., Yamashita, Y., Kida, Y., Sakaguchi, M. (2016)

The N-terminal motif of PMP70 suppresses cotranslational targeting to the endoplasmic reticulum
J. Biochem., 159, 539-551 (DOI: 10.1093/jb/mvv132)

(4) Kang, K., Takahara, M., Sakaue, H., Sakaguchi, M. (2016)

Capsid protease domain as a tool for assessing protein-domain folding during organelle import of nascent polypeptides in living cells
J. Biochem., 159, 497-508 (DOI: 10.1093/jb/mvv129)

以上すべて査読あり

〔学会発表〕(計 25 件)

阪口 雅郎、Two independent modes of recognition of hydrophobic segment at the endoplasmic reticulum translocon (第 18 回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ、2018)

藤田 英伸、Dynamic motion of nascent chain through the ER translocon with back and forth movement (国際シンポジウム Proteins: From the Cradle to the Grave, 2018)

衣斐 義一、ファミリー C に属する ABC トランスポーターの異なる分子種を細胞膜の異なる領域に極性局在化させるシグナル配列 (第 91 回日本生化学会大会、ポスター、2018)

- 藤田英伸, 小胞体トランスロコンでのポリペプチド鎖の動き制限要因と駆動要因(第 91 回日本生化学会大会, ポスター, 2018)
- 菅公秀, 小胞体膜透過因子 Sec71p/Sec72p の作用機序の解明 (第 91 回日本生化学会大会, ポスター, 2018)
- 中川知香, リボソーム結合型分子シャペロン Hsp70 の合成共役型膜透過に対する作用 (第 91 回日本生化学会大会, ポスター, 2018)
- 森川真衣, 膜タンパク質小胞体標的化抑制 (ETS) 因子としてのミリスチル転移酵素 NMT1 (第 91 回日本生化学会大会, ポスター, 2018)
- 小坂優里菜, 粗面小胞体での合成共役型タンパク質膜透過に内腔シャペロンネットワークが関与する (第 91 回日本生化学会大会, ポスター, 2018)
- 衣斐義一, 細胞内に取り込まれた ABCC2 の NECAP1 による apical 側細胞膜への再局在化 (第 41 回分子生物学会年会, ポスター, 2018 年)
- 菅公秀, 出芽酵母小胞体におけるフォールディングプローブを用いた新生鎖膜透過動態解析 (第 41 回分子生物学会年会, ポスター, 2018 年)
- 阪口雅郎, The N-terminal motif of peroxisomal membrane protein PMP70 is ER-targeting suppressor (ETS) (第 17 回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ, 2017)
- 木田祐一郎, 小胞体トランスロコン配列認識部位の特定に向けて (第 17 回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ, 2017)
- 菅公秀, 新規フォールディングプローブを用いた小胞体膜透過チャンネルでの新生鎖透過動態が変動する出芽酵母遺伝子の探索 (第 69 回細胞生物学会大会・口頭発表, 2017)
- 衣斐義一, A clathrin accessory protein NECAP1 relocates internalized ABCC2 to the apical plasma membrane in HepG2 cells. (第 69 回日本細胞生物学会大会・ポスター: 2016 年 6 月 13 日-15 日, 仙台国際センター (仙台))
- 阪口雅郎, 膜タンパク質の小胞体標的化を抑制する機能モチーフ (ETS) と作用因子 (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表, 2017)
- 十倉麻友子, CP-フォールディングプローブによる小胞体トランスロコンにおける伸長透過共役因子の解析 (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表, 2017)
- 衣斐義一, ABCC7/CFTR を細胞膜の apical 側へ標的化させるシグナルの探索 (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表, 2017)
- 木田祐一郎, 通過途上の疎水性配列と相互作用する Sec61 トランスロコン内部のマッピング (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表, 2017)
- Haruka Sakaue, The N-terminal motif of PMP70 suppresses cotranslational targeting to the endoplasmic reticulum (Nascent Chain Biology Meeting 2016, Invited Talk)
- Yuichiro Kida, Recognition of nascent chain at the endoplasmic reticulum translocon is affected by the ribosome (Nascent Chain Biology Meeting 2016, Poster, 2016)
- 衣斐義一, Identification of cis-acting signals required for the apical targeting of ABCC7 (第 89 回日本生化学会大会・ポスター: 2016)
- 木田祐一郎, 小胞体トランスロコンでの新生鎖認識へのリボソームの関与について (第 89 回日本生化学会大会・口頭発表, 2016)
- 菅公秀, 出芽酵母におけるシグナルペプチド作用および膜透過様式と SEC71/72 との関連 (第 68 回日本細胞生物学会大会・ポスター, 2016)

十倉麻友子, 出芽酵母小胞体トランスロコンへの標的化様式のシグナル配列による変化について (第 68 回日本細胞生物学会大会・ポスター、2016)

木田祐一郎, 小胞体トランスロコンによる“低”疎水性配列の膜内保持機構 (第 16 回日本蛋白質科学会年会・ポスター、2016)

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem1/>

6 . 研究組織

研究代表者のみ

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、研究者個人に帰属されます。