

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07758

研究課題名(和文) タンパク質N-ミリスチル化を介した膜タンパク質の新たな機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of novel regulatory mechanisms of membrane proteins mediated by protein N-myristoylation

研究代表者

内海 俊彦 (Utsumi, Toshihiko)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授

研究者番号：20168727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では膜タンパク質に生ずるN-ミリスチル化について解析を行った。その結果、これまで細胞質タンパク質に生じる脂質修飾と考えられてきたタンパク質N-ミリスチル化は、小胞体、ミトコンドリア、オートファゴソーム、lipid droplet といった種々の細胞小器官の膜に局在する膜タンパク質にも生じ、その細胞内局在と機能に重要な役割を果たすことが明らかになった。これらの結果から、N-ミリスチル化を介した膜タンパク質の新たな機能制御機構の存在が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質N-ミリスチル化は、これまで細胞質タンパク質に生ずる翻訳後修飾として知られていたが、本研究により、様々な細胞小器官に存在する多様な膜上構造を有する多くの膜タンパク質に生ずることが明らかにされ、研究の学術的意義は大きい。さらにこれらのタンパク質中には癌や神経変性疾患といった疾患と直接関与するタンパク質が複数含まれていることが示され、疾患発症のメカニズムとN-ミリスチル化との関連が注目される。このことから、本研究結果は高い社会的意義を有していると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Protein N-myristoylation has been recognized as a protein modification that occurs mainly on cytoplasmic proteins. In this study, protein N-myristoylation occurring on membrane proteins was investigated. As a result, it was found that many transmembrane proteins derived from diverse cellular organelles such as endoplasmic reticulum, mitochondria, autophagosome, and lipid droplet were found to be N-myristoylated. It was also revealed that protein N-myristoylation found in these transmembrane proteins play critical roles in targeting to the organelles and/or physiological functions of these membrane proteins.

研究分野：応用生物化学

キーワード：N-ミリスチル化 膜タンパク質 脂質修飾タンパク質 機能制御機構

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の脂質修飾は、リン酸化やグリコシル化と並んで主要なタンパク質翻訳後修飾である。このうちタンパク質 N-ミリスチル化は、細胞の情報伝達とその制御を担う多くの生理活性タンパク質に生じ、細胞の機能発現において極めて重要な役割を果たしている。またその過剰発現や変異が、がん、神経変性疾患、感染症等の多くの疾患に直接関与することが近年次々と明らかにされている。しかし、修飾の検出手法の開発の遅れから全ヒトタンパク質を対象とした網羅的な解析は進んでいなかった。我々は、これまでに、N-ミリスチル化を指令する N-ミリスチル化シグナルを含むタンパク質 N 末端 10 アミノ酸の配列を用いて、無細胞タンパク質合成系における代謝標識により、簡便に N-ミリスチル化タンパク質を試験管内で同定する手法を確立した。この手法を UniProt タンパク質データベースに収集された、アイソフォームを含む約 46,000 個の全ヒトタンパク質に適用し解析を行った結果、171 個もの新規 N-ミリスチル化タンパク質候補を見出した。驚いたことに、これらの新たに見出された N-ミリスチル化タンパク質候補中には、オルガネラ形成因子、タンパク質輸送体、アミノ酸輸送体、イオンチャネル、受容体等を含む約 40 個もの膜貫通タンパク質が含まれていることが明らかになった。そこでこれらの膜タンパク質に生ずる N-ミリスチル化の機能を明らかにすることを目的として、それぞれ小胞体、ミトコンドリアに特異的に局在する膜タンパク質である Protein Lunapark と SAMM50 について解析を行った。その結果、小胞体に局在する 2 回膜貫通型膜タンパク質である Protein Lunapark は細胞での過剰発現により、N-ミリスチル化に依存して小胞体膜の顕著な網目状構造の形成を誘導すること、また、ミトコンドリア外膜に存在する β バレル型膜タンパク質である SAMM50 では、ミトコンドリアへの局在に、N-ミリスチル化が重要な役割を果たすことが示された。これらの結果から、小胞体、ミトコンドリアといった細胞小器官に存在する膜タンパク質に N-ミリスチル化が生じ、この修飾がこれらのタンパク質の細胞内局在や機能発現に重要な役割を果たす事が明らかになった。

### 2. 研究の目的

本研究では、これらの膜貫通タンパク質に生ずる N-ミリスチル化が、Protein Lunapark, SAMM50 といった一部の特殊なタンパク質に生ずる例外的な修飾なのか、あるいは細胞内の多くの膜貫通タンパク質に生じ、その機能発現や制御に関与する新たな膜タンパク質の機能制御機構であるのかを明らかにすることを目的として以下の 2 つの内容に焦点を絞って解析を行った。

- [1] N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質の存在の確認と細胞内局在、膜への組み込み、膜上トポロジー形成における N-ミリスチル化の役割の解明
- [2] オルガネラ形態形成因子や膜輸送体タンパク質の機能発現における N-ミリスチル化の役割とその分子機構の解明

### 3. 研究の方法

N-ミリスチル化された膜貫通タンパク質候補について、その全長配列の C 末端に Flag-tag を付加した野生型、その 2 位 Gly を Ala に置換し N-ミリスチル化を阻害した G2A-変異体、あるいは C 末端に N-グリコシル化部位を導入した TNF(GLC-TNF)を結合させた変異体、のそれぞれの cDNA を構築した。これらを COS-1 細胞に遺伝子導入し、Click Chemistry による手法により N-ミリスチル化を、オルガネラマーカー存在下での免疫染色により細胞内局在を、膜タンパク質分画キットを用いた膜タンパク質分画により膜挿入を、GLC-TNF 融合タンパク質の糖鎖付加の有無により膜上トポロジーを検討した。また、内在性のタンパク質に生ずる N-ミリス

トイル化は、細胞を<sup>[3H]</sup>ミリスチン酸で標識した後、特異抗体を用いた免疫沈降物への<sup>[3H]</sup>ミリスチン酸の取り込みにより検討した。細胞内グリコーゲンの検出はPAS染色により行った。タンパク質-タンパク質相互作用の解析は、解析する2つの標的タンパク質のC末端に、それぞれFlag-tagあるいはEGFPを融合させた融合タンパク質cDNAを作製し、これをCOS-1細胞で共発現させ、抗Flag-tag抗体、あるいは抗GFP抗体を用いた免疫沈降物への標的タンパク質の存在により検討した。

#### 4. 研究成果

[1] 様々な細胞内小器官に局在する膜タンパク質がN-ミリスチル化されている。

これまでに、N-末端10アミノ酸が効率良くN-ミリスチル化を指令することを明らかにした171個のヒト新規N-ミリスチル化タンパク質候補について、アミノ酸配列からタンパク質の膜貫通領域を予測するソフトウェアであるSOSUI, TMHMMを用いて解析を行った結果、40個もの膜貫通タンパク質と予測されるタンパク質が見出された。これらのうち全長cDNAが入手できたタンパク質についてCOS-1細胞に遺伝子導入しN-ミリスチル化をClick Chemistryによる手法により検討したところ、細胞で発現が認められたタンパク質のうち殆どのタンパク質で効率の良いN-ミリスチル化が確認された。さらに、これらのN-ミリスチル化された膜タンパク質に関して、免疫染色法により細胞内局在を検討した結果、新たに見出されたN-ミリスチル化された膜タンパク質中には、小胞体、ミトコンドリア、リゾソーム、オートファゴソーム(Glycophagosome)、Lipid dropletといった、様々な細胞小器官に特異的に存在するN-ミリスチル化タンパク質が存在することが明らかになった。

[2] グリコーゲンオートファジー(Glycophagy)のオートファジー受容体として機能するSTBD1に生ずるN-ミリスチル化の解析

グリコーゲンオートファジー(Glycophagy)のオートファジー受容体として機能する、III型膜貫通タンパク質であるSTBD1のN-ミリスチル化について解析を行った結果、この修飾がSTBD1との結合を介したグリコーゲンのリゾソームへの移行に重要な役割を担っている可能性を示した。また、このSTBD1の細胞内局在にはN-ミリスチル化に加えて、膜貫通領域、グリコーゲン結合ドメインが必要であることを明らかにした。

[3] ミトコンドリア外膜タンパク質SAMM50およびTOMM40に生ずるN-ミリスチル化の解析

これまでの解析からミトコンドリア外膜タンパク質であるSAMM50のミトコンドリア局在にN-ミリスチル化が関与することが示されたことから、ミトコンドリアタンパク質に生ずるN-ミリスチル化に着目して解析を行った。その結果、SAMM50と同様ミトコンドリア外膜タンパク質であるTOMM40や、ミトコンドリア膜間腔タンパク質であるMIC19、MIC25がN-ミリスチル化されていることを見出した。このうち、MIC19のミトコンドリア移行にはSAMM50と同様、N-ミリスチル化が必要とされるのに対し、TOMM40およびMIC25のミトコンドリア移行にはN-ミリスチル化が関与しないことが示された。さらにSAMM50とTOMM40と特異的に相互作用するタンパク質について免疫沈降法により解析を行った結果、ミトコンドリアのクリステ形成に関わるSAMM50がN-ミリスチル化されたMIC19と特異的に結合すること、またこの特異的な結合にN-ミリスチル化が関与していることが明らかになった。

以上の結果から、これまで細胞質タンパク質に生じる脂質修飾と考えられてきたタンパク質N-ミリスチル化は、小胞体、ミトコンドリア、オートファゴソーム、lipid dropletといった種々

の細胞小器官の膜に局在する膜タンパク質にも生じ、その細胞内局在と機能に重要な役割を果たすことが明らかになった。以上、N-ミリスチル化を介した膜タンパク質の新たな機能制御機構の存在が明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kinoshita-Kikuta E, Tanikawa A, Hosokawa T, Kiwado A, Moriya K, Kinoshita E, Koike T, Utsumi T.	4. 巻 14
2. 論文標題 A strategy to identify protein-N-myristoylation-dependent phosphorylation reactions of cellular proteins by using Phos-tag SDS-PAGE.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0225510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0225510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 内海俊彦	4. 巻 271
2. 論文標題 蛋白質N-ミリスチル化が関与する多彩な生命現象と疾患	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1306-1307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Utsumi T, Matsuzaki K, Kiwado A, Tanikawa A, Kikkawa Y, Hosokawa T, Otsuka A, Iuchi Y, Kobuchi H, Moriya K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification and characterization of protein N-myristoylation occurring on four human mitochondrial proteins, SAMM50, TOMM40, MIC19, and MIC25.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0206355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0206355	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito S, Hamamoto S, Moriya K, Matsuura A, Sato Y, Muto J, Noguchi H, Yamauchi S, Tozawa Y, Ueda M, Hashimoto K, Koster P, Dong Q, Held K, Kudla J, Utsumi T, Uozumi N.	4. 巻 218
2. 論文標題 N-myristoylation and S-acylation are common modifications of Ca <sup>2+</sup> -regulated Arabidopsis kinases and are required for activation of the SLAC1 anion channel.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1504-1521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.15053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 内海俊彦	4. 巻 69
2. 論文標題 ミリストイル化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学 (特集: タンパク質、核酸の分子修飾)	6. 最初と最後の頁 488-489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tasaki E, Matsumoto S, Tada H, Kurahashi T, Zhang X, Fujii J, Utsumi T, Iuchi Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 Protective role of testis-specific peroxiredoxin 4 against cellular oxidative stress.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J.Clin. Biochem. Nutr.	6. 最初と最後の頁 156 - 161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.16-96.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 内海俊彦
2. 発表標題 網羅的解析から明らかになるN-ミリストイル化タンパク質が担う多彩な生命 現象
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚葵, 岩本奈津子, 黄波戸亜哉, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリストイル化された膜貫通型タンパク質のオルガネラ局在に関する研究
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川拓郎, 七田真由, 西上美里, 黄波戸亜哉, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 二重アシル化を生じる一回膜貫通型タンパク質ANKRD22の細胞内局在および特異な膜上トポロジーの解析
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川拓郎, 大塚葵, 岩本奈津子, 七田真由, 西上美里, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 二重アシル化を生じる膜タンパク質ANKRD22の細胞内局在および特異な膜上トポロジーの解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩本奈津子, 細川拓郎, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリスチル化タンパク質結合因子UNC119AとFMNL2との相互作用の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西上美里, 大塚葵, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリスチル化されたSCFユビキチンリガーゼ調節因子DCUN1D3に生じるカスパーゼ切断の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 七田真由, 岩田春菜, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 核タンパク質ラミンA/Cアイソフォームに生ずるN-ミリスチル化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本奈津子, 大塚葵, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリスチル化タンパク質結合因子UNC119AとN-ミリスチル化タンパク質との相互作用の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 七田真由, 岩田春菜, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 核タンパク質ラミンA/Cアイソフォームに生ずるN-ミリスチル化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西上美里, 細川拓朗, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 SCFユビキチンリガーゼ調節因子DCUN1D3に生じるN-ミリスチル化及び特異的切断・分解の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 吉川祐希、黄波戸亜哉、守屋康子、内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリスチル化されたグリコゲンオートファジー (Glycophagy) 関連タンパク質STBD1に生ずる特異的タンパク質切断の解析
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国、四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷川綾音、木下恵美子、黄波戸亜哉、守屋康子、木下英司、小池透、内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリスチル化依存的なタンパク質リン酸化反応のPhos- tag SDS-PAGEを用いた解析
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国、四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚葵、吉川祐希、谷川綾音、守屋康子、小林淳、内海俊彦
2. 発表標題 昆虫細胞 (BmN4) 発現系を用いたヒトN-ミリスチル化タンパク質の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第51回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細川拓郎、谷川綾音、吉川祐希、守屋康子、内海俊彦
2. 発表標題 タンパク質N末端脂質修飾の細胞内局在化シグナルとしての特性解析
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第51回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚葵、谷川綾音、守屋康子、小林淳、内海俊彦
2. 発表標題 昆虫細胞発現系を用いた Forminファミリータンパク質に生ずるN-ミリスチル化の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度中四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 細川拓郎、黄波戸亜哉、吉川祐希、守屋康子、内海俊彦
2. 発表標題 二重アシル化を生じる膜貫通タンパク質ANKRD22の特異な膜上トポロジーの解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度中四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川祐希、谷川綾音、大塚葵、細川拓郎、黄波戸亜哉、守屋康子、内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリスチル化されたグリコーゲンオートファジー関連タンパク質STBD1に生ずる特異的タンパク質切断
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内海俊彦、小林淳、守屋康子
2. 発表標題 カイコBmN4細胞を用いた遺伝子導入、遺伝子発現観察キットの開発
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黄波戸亜哉, 松崎嘉奈子, 高光恵美, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 核内受容体LXRの標的遺伝子産物EPPD1に生ずる二重のアシル化修飾の解析
3. 学会等名 第58回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川祐希, 谷川綾音, 黄波戸亜哉, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 グリコーゲンオートファジー (Glycophagy) のオートファジー受容体として機能する膜貫通タンパク質STBD1に生ずるN-ミリスチル化の解析
3. 学会等名 第58回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黄波戸亜哉, 谷川綾音, 吉川祐希, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 N-ミリスチル化とS-パルミトイル化の二重のアシル化修飾を生ずるヒトタンパク質の探索とその多様な細胞内局在
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉川祐希, 谷川綾音, 黄波戸亜哉, 守屋康子, 内海俊彦
2. 発表標題 グリコーゲンオートファジー (Glycophagy) 関連タンパク質STBD1に生ずる N-ミリスチル化の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 谷川綾音、木下恵美子、黄波戸亜哉、守屋康子、木下英司、小池透、内海俊彦
2. 発表標題 Phos-tag SDS-PAGEを用いたN-ミリスチル化依存的なタンパク質リン酸化反応の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 内海俊彦、小林淳、守屋康子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株) NTS	5. 総ページ数 303
3. 書名 カイコの実験単(「生物の科学 遺伝」別冊)(分担)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

内海俊彦 <a href="http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/utsumi/index.html">http://www.agr.yamaguchi-u.ac.jp/member/utsumi/index.html</a>
---

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----