

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15089

研究課題名(和文)シグナルペプチド非依存的に小胞体へ輸送されるタンパク質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Analysis of signal peptide-independent protein translocation into the endoplasmic reticulum

研究代表者

細見 昭 (Hosomi, Akira)

信州大学・学術研究院農学系・助教

研究者番号：60525864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、出芽酵母におけるシグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送機構の解明である。本輸送機構を明らかにするために、元々シグナルペプチドを持たないが小胞体に輸送されるタンパク質の同定を試みた。その結果、シグナルペプチドを持たない核タンパク質であるRme1が小胞体へ輸送され、N型糖鎖修飾されることが分かった。Rme1の存在は、シグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送機構が出芽酵母に本来備わったものであることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の分泌は小胞体シグナルペプチドが必要と考えられてきた。一方で、細胞質タンパク質が直接細胞外に出る経路が存在する。この経路は旧来の分泌経路を経ないので非古典的分泌と呼ばれている。近年のタンパク質の網羅的解析でシグナルペプチドを持たないがN型糖鎖修飾されるタンパク質が非古典的分泌に分類されている。しかし、N型糖鎖修飾は小胞体内腔で起こるので、非古典的分泌には分類できない。したがって、シグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送は、これまでの輸送とは異なる新たなタンパク質輸送機構であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is clarification of mechanism of signal peptide-independent protein translocation into the endoplasmic reticulum in budding yeast. To clarify the mechanism, we tried to identify endogenous proteins that do not contain a conventional signal peptide but are still translocated into the ER in budding yeast. Through our analysis, we identified that a portion of a signal peptide-less, nuclear protein Rme1 can be translocated into the ER where is then undergoes N-glycosylation. The presence of Rme1 suggests that budding yeast contain a system for signal peptide-independent protein translocation into the ER.

研究分野：タンパク質輸送

キーワード：タンパク質輸送 シグナルペプチド 酵母

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

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内でタンパク質が正しく機能するためには、目的地に正しく輸送される事が重要である。細胞は様々な洗練された輸送機構を有している。そのうちの一つがギンター・ブローベルによって提唱された“シグナルペプチド”のシステムである。真核生物において、分泌経路(小胞体 ゴルジ体 細胞外/液胞(リソソーム))を通る可溶性のタンパク質は細胞質から小胞体へ入るための目印となる配列をそのN末端に持っており、これが小胞体シグナルペプチドである。真核生物の分泌経路において、可溶性タンパク質が小胞体へ輸送されるためには小胞体シグナルペプチドが必要と考えられてきた。一方で、シグナルペプチドを持たないにもかかわらず小胞体へ輸送されるタンパク質が以前から報告されていた。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、シグナルペプチド非依存的な輸送が促進される *ste24* 遺伝子破壊株を発見した。この結果は *Ste24* タンパク質がシグナルペプチド非依存的な輸送を抑制する事を示しており、また、この輸送機構が何かしらの調節を受けている事を示唆している。そこで、出芽酵母を用いて、真核生物におけるシグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送機構を明らかにすることを目的にした。

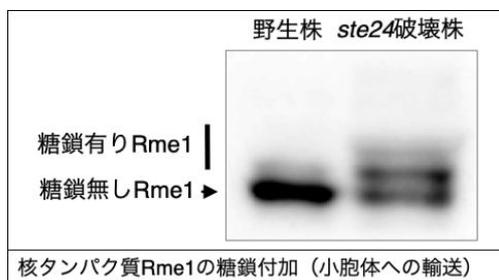
### 3. 研究の方法

申請者は小胞体関連分解 (ER-associated degradation(ERAD)) に関する研究で、ERAD で分解される糖タンパク質の同定を IGOT (isotope-coded glycosylation-site-specific tagging) 法で行った。その過程で、シグナルペプチドや膜貫通領域を持たないにも関わらず N型糖鎖付加されている可能性のあるタンパク質 34 個を発見した。そこで、この 34 個の候補タンパク質の N型糖鎖付加をウエスタンブロッティングにて確認することにした。一個でも N型糖鎖付加が確認されれば、シグナルペプチドを持たないタンパク質が小胞体へ輸送されていることの証明になり、シグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送機構が本来酵母に備わっていると言えると考えた。

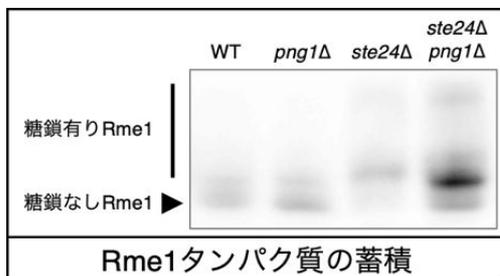
また、シグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送の真核生物における普遍性とその詳細を解明するために哺乳類タンパク質を出芽酵母に発現させて解析を行うことにした。具体的には、出芽酵母に FGF9 及び FGF16 を発現させウエスタンブロッティングにて N型糖鎖修飾が起こるかを調べた。

### 4. 研究成果

これまでの研究では、元々シグナルペプチドを持っているカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) のシグナルペプチド削除体 (CPYASP) を用いて解析を行ってきた。その過程で、元々シグナルペプチドを持たないが N型糖鎖修飾されるタンパク質があるのではないかと考え解析を試みた。候補は、以前に申請者らが質量分析を用いた研究で発見した N型糖鎖修飾が予想される 34 個のタンパク質である。34 個のうち 20 個のクローニングに成功した。野生株と *ste24* 遺伝子破壊株を用いてウエスタンブロッティングを行なった結果、Rme1 タンパク質に N型糖鎖修飾が起こること、その修飾が *ste24* 遺伝子破壊株で促進されることが明らかになった。Rme1 タンパク質は核のタンパク質として報告されており、シグナルペプチド様の配列をその N末端に有しない。ゆえに、上記の結果は、シグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送が、元々酵母に備わっていることを示唆している。



興味深いことに、小胞体関連分解で機能する細胞質 N型糖鎖脱離酵素 PNGase をコードする *PNG1* と *STE24* の二重遺伝子破壊株で、Rme1 が蓄積することが分かった。この結果は、小胞体に輸送された Rme1 が細胞質に逆輸送され、Png1 に立つ糖鎖された後プロテアソームで分解されることを示唆しているが、Png1 存在下で糖鎖脱離型 Rme1 を検出できなかったため、Png1 が直接 Rme1 の N型糖鎖を切断しているかは分からなかった。



また、哺乳類におけるシグナルペプチド非依存的に小胞体へ輸送されるタンパク質の候補として FGF9 及び FGF16 の解析を試みた。FGF9、FGF16 は典型的なシグナルペプチドの配列を有さない。FGF9 及び FGF16 の出芽酵母発現用合成遺伝子を購入し、出芽酵母発現用ベクターに組み込んだ。野生株と *ste24* 遺伝子破壊株を用いてウエスタンブロッティングを行なった結果、両タンパク質とも N 型糖鎖修飾は見られなかった。この結果から、FGF9 及び FGF16 は、出芽酵母において、シグナルペプチド非依存的経路で輸送されるかは分からなかった。本研究では、シグナルペプチドを元々持たないが小胞体へ輸送されるタンパク質として Rme1 を同定することができたが、Rme1 上に存在すると考えられる輸送シグナルや、詳細な分子機構は依然として不明である。また、真核生物共通のタンパク質輸送機構であるのかについても明らかにする必要が考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。