

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18770095

研究課題名 (和文) 小胞体トランスロコンを介した膜トポロジー形成機構

研究課題名 (英文) Topogenesis of membrane proteins via the ER translocon.

研究代表者

木田 祐一郎 (KIDA YUICHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教

研究者番号：10423899

研究成果の概要：

細胞及び細胞内小器官を取り囲む生体膜に埋まり込んでいる「膜タンパク質」は、膜内外の物質輸送、情報交換、膜構造の形成・維持に機能している。細胞内に存在する膜タンパク質の半分以上が、小胞体タンパク質膜透過チャンネル(トランスロコン)を介して膜に組み込まれる。本研究では、膜貫通配列の小胞体膜組み込み制御系を構築し、組み込み過程を詳細に解析することで、膜貫通の方向性(膜トポロジー)の形成過程、及びトランスロコンの活動時の挙動に関する知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	330,000	4,030,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：膜タンパク質、シグナル配列、膜透過、トランスロコン、小胞体

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の外周及び細胞内小器官(オルガネラ)は、主に脂質とタンパク質で構成される生体膜によって仕切られている。生体膜に埋まり込んだ「膜タンパク質」は、膜内外の物質輸送、情報交換、及び膜構造の形成・維持などの機能を担っており、生命に必須の存在である。膜タンパク質も、他のタンパク質と同様に細胞質のリボソームで合成されるが、適切なオルガネラに配置され、正しい膜内外の方向性で膜に組み込まれ、立体構造を形成

して初めて機能を発揮できる。

真核細胞が有する膜タンパク質の約 70% は、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、細胞膜などのいわゆる分泌系オルガネラに存在している。それらの殆どは、小胞体において膜に組み込まれた後、各オルガネラへと輸送される。膜タンパク質の膜組み込み機構については、小胞体の系で最も研究が進んでおり、膜組み込みが分泌タンパク質等の膜透過と共通のタンパク質膜透過チャンネル(トランスロコン)を介して行われることが明らかとな

ってきている。近年、トランスロコンの古細菌ホモログで構造解析がなされ、静止状態の構造は示されたが、膜組み込みの実際の過程についてはまだまだ不明な点が多い。

研究代表者は、アミノ末端側を小胞体内腔に配置しつつ膜に組み込まれる膜貫通配列 [1 型シグナルアンカー (SA-I) 配列] の組み込み過程の解析や、アミノ末端側ドメインの膜透過制御実験系構築などで成果を挙げてきている。本研究では、SA-I 配列の膜組み込み、特にアミノ末端側ドメインを膜透過させて貫通方向 (膜トポロジー) を決定する過程の詳細な解析を通じて、トランスロコンの基質であるポリペプチド鎖のダイナミクス、更にトランスロコン自体の活動時における挙動を追究しようと考えた。

## 2. 研究の目的

研究代表者らの最終目標は、小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質構造形成機構の全面的な理解にある。本研究では、以下に示すアプローチにより研究を進めている。

(1) トランスロコンを介した膜トポロジー形成と膜透過のメカニズム: SA-I 配列アミノ末端側ドメインの膜透過の停止・再開を制御できる実験系を構築・改良し、膜透過の素過程を詳細に解析することで、膜透過ダイナミクスや膜透過の駆動システムの解明につなげる。

(2) トランスロコンのフレキシブルな挙動: 上記膜透過制御系などを利用して、単一の膜タンパク質において複数の内腔側ドメインが同時に透過途中で停止した中間状態を形成できている (後述を参照)。この組み込み中間状態とトランスロコンとの相互作用解析などから、トランスロコンの活動時における挙動を追究する。

(3) トランスロコン関連因子の解析: 酵母ではトランスロコンと複合体を形成し、膜透過に機能することが分かっているが、高等動物での機能は未知であるタンパク質、Sec62 及び Sec63 について機能解析を行う。

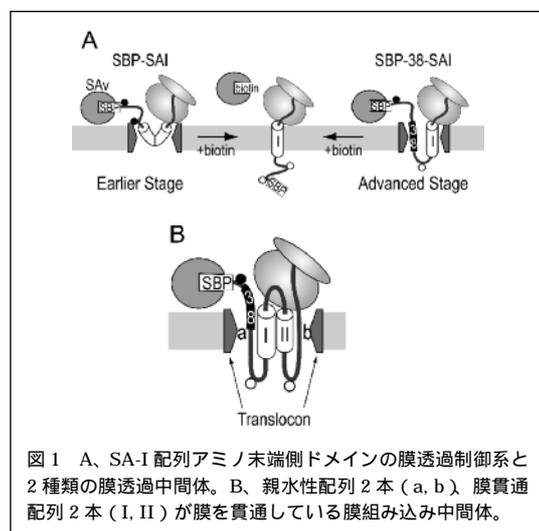
## 3. 研究の方法

我々は以前より膜組み込みのモデルとして SA-I 配列を用いている。アミノ末端側ドメインを膜透過しつつ膜に組み込まれるため、アミノ末端を細胞質側で捕捉することにより組み込み中間状態の形成が可能となっている。また、本研究の主要な実験手法である無細胞系 (無細胞タンパク質合成系 + 粗面小胞体) は、合成中間状態を形成できることから、合成に共役した膜組み込みの解析に非常に有効であるとともに、細胞質成分を容易に操作できるという利点もある。以上を利用して、膜組み込みを停止・再開できる制御実験系の構築、組み込み中間状態の解析、

及び 膜組み込み再開後の挙動解析、などの研究を進めている。

## 4. 研究成果

(1) SA-I 配列アミノ末端側ドメイン膜透過制御系の構築: 我々は以前に、SA-I 配列のアミノ末端側にマウスジヒドロ葉酸還元酵素を融合することで、リガンド (メトトレキサート) 存在下で膜透過停止、その後の除去によって透過再開する、というフォールディングを利用した膜透過制御系について報告した (Kida et al., EMBO J 2005)。しかし、膜透過速度が遅いことやリガンドの除去が煩雑であることから、新たに簡便かつ高効率な膜透過制御系の構築を試みた。マウスシナプトタグミン II (SA-I タンパク質) のアミノ末端にストレプトアビジン (SAv) との親和性の高いタグ配列 [streptavidin-binding peptide (SBP) タグ] を融合し、無細胞系で発現させたところ、SAv によって SBP タグを細胞質側でトラップすることで膜透過を阻止できた (図 1A, Earlier Stage)。また、SBP タグと SA-I 配列の間に親水性配列を挿入して間隔を広げることで、SA-I 配列とアミノ末端親水性ドメインが共に膜を貫通している膜透過中間体が形成された (図 1A, Advanced Stage)。どちらの場合も、その後のビオチン添加によって膜透過が再開した (図 1A)。再開後約 30 分で 70% 以上の膜透過効率に達することも分かり、膜透過をより簡便に制御できる実験系を構築することができた。



(2) トランスロコンの特性解析: トランスロコン本体である Sec61 複合体については、古細菌ホモログの結晶構造よりチャネル孔の大きさはポリペプチド鎖 1 本程度であると予測されているが、「トランスロコン」としての孔はこれよりも大きいという報告もあり、活性状態での孔サイズは議論となっている。前述の膜透過中間体によって 1 個の Sec61

チャンネルが塞がれると考えられるため、更にその下流に融合した膜貫通配列の組み込みへの影響を調べることで、トランスロコンのポリペプチド鎖収容特性について検討を行った。SA-I 配列の下流にカルボキシル末端側を膜透過させる膜貫通配列[ II 型シグナルアンカー (SA-II) 配列 ] を融合したところ、SA-II 配列の膜組み込みは上流の中間体による影響を受けなかった。更に、終止コドンを持たない mRNA を無細胞系にて翻訳することで、アミノ末端をストレプトアビジン、カルボキシル末端をリボソームで細胞質側にトラップし、SA-I 配列上流と SA-II 配列下流の 2 本の内腔側親水性セグメントが膜を貫通したまま停止した膜組み込み中間体を形成できた(図 1B)。2 本の親水性配列が共に Sec61 チャンネルと近接していることも部位特異的架橋反応により示され、複数の Sec61 チャンネルが協調して膜組み込みを行う可能性が示唆された。

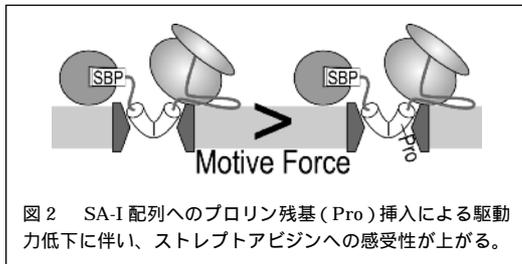


図2 SA-I 配列へのプロリン残基 (Pro) 挿入による駆動力低下に伴い、ストレプトアビジンへの感受性が上がる。

(3) SA-I 配列疎水性コア配列のアミノ末端側ドメイン膜透過への関与: SA-I 配列アミノ末端側ドメインの膜透過には、ATP、GTP などのエネルギー物質や小胞体内腔の分子シャペロンが必要でないことを既に報告している (Kida et al., EMBO J 2005)。そこで、SA-I 配列の膜組み込みが直接膜透過を駆動する可能性について検討した。前述の SBP タグ-SA-I 配列融合タンパク質において、膜透過は SA<sub>v</sub> の濃度依存的に阻害される。SA-I 配列の疎水性コア配列にプロリン残基を挿入したところ、SA<sub>v</sub> 非存在下での膜透過には影響ないが、SA<sub>v</sub> への感受性が増大し、10 倍程度低濃度でも膜透過が阻止されるようになった(図 2)。また、心筋タンパク質タイチンの免疫グロブリン様 127 ドメインは、力学的アンフォールディングに 200 pN もの力を要する固いドメインである。これを SA-I 配列のアミノ末端に融合してもアンフォールディングしながら膜透過することができるが、SA-I 配列へのプロリン挿入によりこの膜透過効率も減少した。このことは、SA-I 配列の配列特性が膜透過可能な負荷の大きさと相関することを示している。更に、127 ドメインと SA-I 配列との間隔を広げることで膜透過効率が著しく減少したことから、SA-I 配列と負荷配列との距離も重要であることが

分かった。SA-I 配列は、上流の一定領域の膜透過駆動に強く関与することが示された。

(4) トランスロコン関連因子の解析: Sec62、Sec63 について、ヒト脳組織由来の RNA を使って RT-PCR を行い、cDNA を取得した。それぞれを 293H 細胞に導入することで、各タンパク質の安定発現株を作成し、ジギトニン(界面活性剤)による可溶化後、各タンパク質を精製したところ、共精製されるタンパク質が複数見つかった。現在は、それらとの複合体について解析を進めるとともに、細胞内での機能解析にも着手している。

## 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 3 件)

1. Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M.  
Signal-anchor sequence provides motive force for polypeptide-chain translocation through the ER membrane. *J. Biol. Chem.*, 284, 2861-2866. (2009)
  2. Tsuchida, M., Emi, Y., Kida, Y., and Sakaguchi, M.  
Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369, 369-375. (2008)
  3. Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M.  
Two translocating hydrophilic segments of a nascent chain span the ER membrane during multispansing protein topogenesis. *J. Cell Biol.*, 179, 1441-1452. (2007)
- 1-3、いずれも査読有り。

[ 学会発表 ] (計 16 件)

1. Sakaguchi, M.  
Dynamic function of ER translocon.  
BMB2008, 2008 年 12 月 12 日, 神戸
2. 藤田英伸  
正荷電アミノ酸残基による小胞体膜透過制御  
BMB2008, 2008 年 12 月 9 日, 神戸
3. 木田祐一郎  
膜貫通配列の小胞体膜組み込みダイナミクス  
BMB2008, 2008 年 12 月 9 日, 神戸
4. 岩下昌平  
PMP70 の N-末端に存在する小胞体標的化抑制モチーフ  
BMB2008, 2008 年 12 月 9 日, 神戸

5. 佃美和  
ペルオキシソームABC輸送体におけるオルガネラ標的化シグナルの階層構造  
BMB2008, 2008年12月9日, 神戸
6. Kida, Y.  
Lateral movement of a signal-anchor sequence from translocon to lipid environment.  
EMBO Conference Series "Control, Co-ordination and Regulation of Protein Targeting and Translocation", 2008年10月27日, Ste. Maxime (France)
7. 木田祐一郎  
膜貫通配列のトランスロコンを介した水平方向のダイナミクス  
第8回日本蛋白質科学会年会, 2008年6月11日, 東京
8. 木田祐一郎  
ポリペプチド鎖小胞体膜透過のシグナルアンカー配列による駆動メカニズム  
BMB2007, 2007年12月12日, 横浜
9. 土田 雅史  
ABC6 はミトコンドリアではなく細胞内分泌経路に局在する  
BMB2007, 2007年12月12日, 横浜
10. 阪口 雅郎  
PMP70 分子内の細胞内局在化シグナルの相互関係  
BMB2007, 2007年12月12日, 横浜
11. Kida, Y.  
Translocon accommodates two translocating hydrophilic chains and two signal sequences.  
Gordon Research Conference on Protein Transport Across Cell Membranes, 2007年6月11日, Lucca (Italy)
12. Sakaguchi, M.  
Flexibility of translocon and driving force for polypeptide chain translocation. 第59回日本細胞生物学会大会, 2007年5月28日, 福岡
13. Kida, Y.  
Translocon accommodates two translocating hydrophilic chains and two transmembrane sequences simultaneously.  
第59回日本細胞生物学会大会, 2007年5月28日, 福岡
14. 木田祐一郎  
ポリペプチド鎖小胞体膜透過の膜貫通配列による駆動システム  
第7回日本蛋白質科学会年会, 2007年5月24日, 仙台
15. Kida, Y.  
Function of Positive Charges Following Signal-Anchor Sequences

during Translocation of the N-terminal domain.

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006年6月23日, 京都

16. 木田祐一郎  
シグナルアンカー配列によって引き起こされるポリペプチド鎖膜透過のメカニズム  
第6回日本蛋白質科学会年会, 2006年4月24日, 京都

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木田 祐一郎 (KIDA YUICHIRO)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教  
研究者番号: 10423899

# 様式 C-19 (記入例)

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 年 月 日現在

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2004～2007

課題番号：16000000

研究課題名 (和文) に関する研究

研究課題名 (英文) AAAAAAAAAAAAA

研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)

大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：

研究成果の概要：

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2005年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2006年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2007年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
年度			
総計	40,000,000	12,000,000	52,000,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

(1)

(2)

2. 研究の目的

(1)

(2)

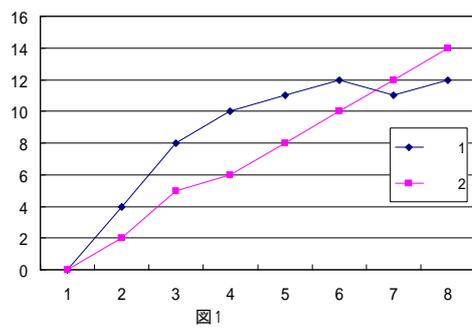
### 3. 研究の方法

(1)

(2)

### 4. 研究成果

(1)

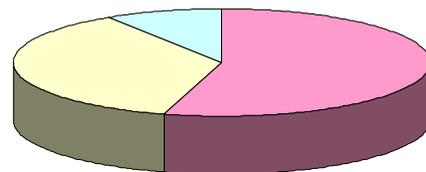


(2)

(3)

(4)

(5)



(6)

(7)

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10件)

学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

〔図書〕(計2件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 件）

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

取得状況（計 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

### (2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)  
大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：