

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05502

研究課題名（和文）リーダーレスタンパク質の小胞体内へのタンパク質輸送機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of protein translocation mechanism of leaderless proteins 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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題の目的は、真核モデル生物である出芽酵母におけるシグナルペプチドに依存しない小胞体内へのタンパク質輸送機構の解明である。STE24遺伝子とHRD1遺伝子の二重破壊株でヒトSOD1が小胞体内に輸送され、さらに、小胞体内へ輸送されたヒトSOD1が細胞外に分泌されることが明らかになった。また、分泌されたヒトSOD1が変性していることが明らかになった。これらの結果から、本来細胞質に存在するヒトSOD1の一部が小胞体を経て分泌され、細胞内の輸送過程で立体構造が崩れる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物において、可溶性タンパク質が小胞体内へ輸送されるためには、輸送されるタンパク質自身が持つ小胞体シグナルペプチド（以下、SPと記載）が必要とされる。ゆえに、SPを持たないタンパク質は小胞体内へ輸送されないと考えられてきた。一方で、SPを持たない一部のタンパク質が小胞体内に存在することが報告されていた。本研究では、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の原因タンパク質の一つであるヒトSOD1を用いた。ヒトSOD1はSPを持たない細胞質局在タンパク質であるが、一部が小胞体内に存在する可能性が示されていた。出芽酵母を用いた解析の結果、ヒトSOD1が小胞体を経て分泌されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research project is to elucidate the signal peptide-independent protein translocation mechanism into the endoplasmic reticulum in the eukaryotic model organism, budding yeast. It was revealed that human SOD1 is translocated into the endoplasmic reticulum in a double mutant of the STE24 gene and the HRD1 gene, and that the human SOD1 translocated into the endoplasmic reticulum is secreted outside the cell. It was also revealed that the secreted human SOD1 is misfolded. These results suggest that a portion of human SOD1 that is originally present in the cytosol is secreted through the endoplasmic reticulum, and that may be misfolded during the intracellular transport process.

研究分野：細胞内タンパク質輸送

キーワード：細胞内タンパク質輸送 分泌 シグナルペプチド SOD1 Ste24

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物において、分泌経路(小胞体→ゴルジ体→細胞外)で輸送される可溶性タンパク質には、小胞体内への輸送の目印として小胞体シグナルペプチドが存在する。この小胞体シグナルペプチドが小胞体内への輸送を規定するとされている。したがって、小胞体シグナルペプチドを持つタンパク質のみが小胞体内へ輸送されうると考えられてきた。しかしながら、一方で、小胞体シグナルペプチドを持たないにもかかわらず小胞体内に存在するタンパク質がいくつも報告されていた。つまり、真核生物には小胞体シグナルペプチドに依らない(リーダーレス)タンパク質輸送が存在すると考えられる。

出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)を用いたこれまでの解析で小胞体シグナルペプチドに依存しない輸送の抑制因子として **Ste24** タンパク質を発見している。加えて、小胞体シグナルペプチドに依存しない輸送が促進される *ste24* 遺伝子破壊株を用いて、出芽酵母の小胞体シグナルペプチドを持たない **Rme1** が小胞体内へ輸送されることが明らかになっている。

このように出芽酵母を用いた解析で小胞体シグナルペプチドに依存しない小胞体内へのタンパク質輸送が明らかになってきたが、**Ste24** のタンパク質としての機能や輸送されるタンパク質の何が認識されるのか、ヒトのタンパク質も本輸送機構で輸送されるのかなどが新たな疑問として生じている。

## 2. 研究の目的

小胞体シグナルペプチドに依らない輸送の抑制因子である **Ste24** は同定できたが、**Ste24** がどのように輸送を抑制しているかの詳細は不明である。そこで、**Ste24** の分子機能を明らかにする。申請者は、*ste24* 遺伝子破壊株を利用して、シグナルペプチド配列を持たないが小胞体内へ輸送されるタンパク質である **Rme1** の同定に成功した。しかしながら、輸送されるタンパク質の認識機構は不明のままである。そこで、これまでに輸送されることが分かったタンパク質を用いて輸送されるタンパク質の認識機構を明らかにする。筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因タンパク質であるヒト **SOD1** も細胞質タンパク質であるにもかかわらず脳脊髄液中に分泌されることが示唆されている。ヒト **SOD1** のホモログである出芽酵母 **Sod1** が小胞体内へ輸送されるかを調べたところ、*ste24* 遺伝子破壊株において一部が小胞体内へ輸送される結果を得られた。ゆえに、ヒト **SOD1** も小胞体内へ輸送されると推測される。そこで、ヒト **SOD1** が小胞体内へ輸送されうるとかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) **Ste24** がプロテアーゼであるため輸送されるタンパク質を切断することによって輸送を抑制すると考えた。そこで、**Ste24** 存在下でのみ、切断によって生じると考えられる中間体をウエスタンブロッティングで検出することを試みた。

(2) これまでの経緯から輸送されるタンパク質のシステインと **Sec61** のシステインとの相互作用が輸送に寄与するという仮説を立てた。これを検証するために、**Sec61** システイン変異株(C373S)と輸送されるタンパク質(シグナルペプチド削除型 **CPY**、シグナルペプチド削除型 **Mid1**)のシステイン変異型を作製して、タンパク質の輸送の有無を *N* 型糖鎖修飾による分子量の増加をウエスタンブロッティングで確認することでシステインの輸送への寄与の確認を試みた。

(3) ヒト **SOD1** の小胞体内への輸送を解析する。具体的には、*ste24* 遺伝子破壊株を用いてウエスタンブロッティングで小胞体内への輸送の確認を行う。

## 4. 研究成果

(1) シグナルペプチド削除型 **CPY\***、シグナルペプチド削除型 **Mid1** 及び **Rme1** を用いて解析を行った結果、**Ste24** の存在依存的にこれら3つのタンパク質全てで切断中間体が検出された。つまり、**Ste24** はこれらのタンパク質を切断することが明らかになった。したがって、**Ste24** は小胞体に近づくシグナルペプチドを持たないタンパク質を切断することで輸送を防ぐことが強く示唆された。

(2) シグナルペプチド削除型 **CPY\***を用いて解析を行った。シグナルペプチド削除型 **CPY\***のシステイン変異体を作成して解析した結果、シグナルペプチド削除型 **CPY\***システイン変異体が小胞体内に輸送される割合が下がることが明らかになった。この結果は、輸送されるタンパク質中のシステイン残基が輸送に寄与することを示唆している。加えて、小胞体内へのタンパク質輸送体である **Sec61** のシステイン変異体の解析の結果、**Sec61** のシステインもシグナルペプチド非依存的輸送に寄与することがわかった。

(3) 出芽酵母にヒト **SOD1** を発現させて解析を行った。*STE24* 遺伝子と *HRDI* 遺伝子の二重破壊株

においてヒト SOD1 の一部に *N*型糖鎖修飾が検出された。したがって、ヒト SOD1 が小胞体内に輸送されることが明らかになった。加えて、小胞体内へ輸送されたヒト SOD1 が最終的に細胞外へ分泌されるのか解析したところ、分泌されることが明らかになった。分泌実験において、分泌されたヒト SOD1 が変性した SOD1 を認識する抗体で検出された。これらの結果から、本来細胞質に存在するヒト SOD1 の一部が分泌される過程で変性する可能性が示唆された。ALS 原因タンパク質であるヒト SOD1 の結果を受けて、他の神経変性疾患であるアルツハイマー病の原因タンパク質とされる Tau の輸送解析も行った。実験の結果、*STE24* 遺伝子と *HRDI* 遺伝子の二重破壊株において断片化された Tau が検出された。本切断中間体が二重破壊株に特異的で検出されたため断片化 Tau が小胞体内へ輸送されている可能性が考えられた。しかしながら、Tau の切断中間体が *N*型糖鎖修飾されているかを調べたが *N*型糖鎖修飾されているという明確な結果は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosomi Akira, Okachi Chinatsu, Fujiwara Yudai	4. 巻 666
2. 論文標題 Human SOD1 is secreted via a conventional secretion pathway in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 101 ~ 106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.05.022	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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡野周太郎、細見昭
2. 発表標題 出芽酵母におけるTauタンパク質の輸送機構の解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原侑大、細見昭
2. 発表標題 ALS原因タンパク質SOD1の輸送・分泌を抑制する化合物の探索
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山陽祐、細見昭
2. 発表標題 シグナルペプチド非依存的輸送に影響を与える物質および細胞内環境
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡野周太郎、細見昭
2. 発表標題 出芽酵母を用いたTauタンパク質の輸送機構の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原侑大、細見昭
2. 発表標題 ALS原因タンパク質SOD1の輸送・分泌を抑制する化合物の探索
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 LE THI HOANG UYEN、細見 昭
2. 発表標題 Tauタンパク質の輸送機構の解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原侑大、細見昭
2. 発表標題 ALS原因タンパク質SOD1の輸送・分泌機構の解明
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第55回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川卓弥、細見昭
2. 発表標題 シグナルペプチド非依存的な小胞体内腔へのタンパク質輸送を阻害する化合物の検証
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞嶋裕也、細見昭
2. 発表標題 シグナルペプチド非依存的な小胞体内へのタンパク質輸送におけるシステインの役割
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下嵩、細見昭
2. 発表標題 シグナルペプチド非依存的なタンパク質輸送における細胞質シャペロンの機能解明
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 LE THI HOANG UYEN、細見昭
2. 発表標題 Tauタンパク質の輸送機構の解明
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原侑大、細見昭
2. 発表標題 ALS原因タンパク質SOD1の輸送・分泌機構の解明
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下 高、細見 昭
2. 発表標題 タンパク質のシグナルペプチド非依存的な輸送における細胞質シャペロンの機能解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川卓弥、細見 昭
2. 発表標題 split-GFPを用いた小胞体内腔へのタンパク質輸送検出方法の構築
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞島裕也、細見 昭
2. 発表標題 シグナルペプチド非依存的なタンパク質の小胞体への輸送におけるSte24の解析とシステインの役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------