

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19262

研究課題名（和文）細胞内タンパク質選別輸送・膜挿入に関わる真核生物由来の糖脂質の同定と構造機能解析

研究課題名（英文）Identification and analysis of the structure-function relationship of eukaryotic glycolipids involved in protein sorting and insertion into membranes

研究代表者

西山 賢一（Nishiyama, Ken-ichi）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80291334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質が細胞質で生合成されたのち、それらが機能を発揮する場所に局在化する。多くのタンパク質がオルガネラや細胞質膜に挿入する。この分子機構は、基本的なレベルではすべての生物で保存されている。大腸菌では糖脂質MPlaseが膜挿入に必須である。本研究では、ヒト由来の細胞のミトコンドリアや小胞体にMPlaseホモログが存在することを実証し、その精製、構造機能解析を通して局在化機構が不明な、膜タンパク質の選別輸送・膜挿入機構を明らかにすることを目的に研究を進めた。ミトコンドリアや小胞体にはそれぞれ特有のMPlaseホモログが存在し、膜挿入だけでなく選別輸送にも関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の細胞内局在や膜挿入の分子機構については、様々な手法を用いて精力的に研究されている。特に、タンパク質性の因子については、局在化・選別輸送や膜挿入に関わる因子はすべて同定されていると考えられている。一方、非タンパク質性の因子については、比較的注目されてこなかった。本研究で同定した、オルガネラの各MPlaseホモログは、タンパク質選別輸送・膜挿入といったタンパク質局在化に関する未解明の問題をすべて解決する最後の「ミッシング・ピース」とも位置付けされるものと言える。特に、ミトコンドリアは老化や生活習慣病にも深くかかわるオルガネラであるため、これらの分子機構の解明も進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：After proteins are biosynthesized in the cytosol, they are localized where they function. Many proteins insert into organelles or cytoplasmic membranes. This molecular mechanism is conserved in all organisms at a fundamental level. In *E. coli*, the glycolipid MPlase is essential for membrane insertion. In this study, we demonstrated the presence of MPlase homologues in mitochondria and ER of cells of human origin, and through their purification and structure-function analysis, we aimed to clarify the sorting, transport, and membrane insertion mechanisms of membrane proteins whose localization mechanisms are unknown. We found that mitochondria and ER have unique MPlase homologs, which are involved not only in membrane insertion but also in sorting and transport.

研究分野：生化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：タンパク質細胞内輸送 タンパク質選別輸送 タンパク質膜挿入 ミトコンドリア 小胞体 糖脂質 MPlase

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質が細胞質で生合成されたのち、それらが機能を発揮する場所に適切に輸送され、局在化する。その際、特異的なオルガネラの膜に組み込まれたり膜透過したりする。また、あるものは細胞外にまで分泌される。タンパク質が局在化するためには、タンパク質自身に目的地を示す局在化シグナルがコードされ、そのシグナルを認識して目的地に輸送するシステムが存在する。これまで膨大な量の研究により、局在化シグナルの詳細や、シグナル認識・局在化に関わる因子群が同定され、タンパク質局在化システムはほぼ全容が解明されたと言っても過言ではない。それにもかかわらず、一部の膜タンパク質の局在化機構は未だに不明である。たとえば、ミトコンドリアの Tom5 や小胞体膜の cytochrome b5 (Cyt b5) は、それぞれのオルガネラ表層の膜タンパク質であり、C 末端領域に膜貫通領域を有する TA (Tail-anchored) タンパク質である。これらのタンパク質の局在化シグナルは膜貫通領域の後の電荷の数であることが明らかにされているものの、その局在化シグナルの認識機構、それに続く膜挿入機構は全く不明である。

我々は、モデル生物大腸菌を用いて細胞質膜に挿入するタンパク質の膜挿入機構を研究してきた。その結果、MPIase (Membrane Protein Integrase) と命名した糖脂質がタンパク質膜挿入に必須であることを明らかにした。MPIase はタンパク質膜挿入に関わる SecYEG や YidC などと協働して膜挿入反応を触媒するが、単純な膜タンパク質は MPIase のみに依存して膜挿入が進行する。SecYEG や YidC 等はすべての生物でホモログが発見されていることを考えると、MPIase のホモログもすべての生物で保存されている可能性が強い。この可能性を検証するため、予備実験としてヒト由来の HeLa 細胞からミトコンドリアや小胞体画分を調製し、MPIase 精製時と同様の抽出を行いリポソームに再構成すると膜挿入活性が検出され、MPIase ホモログが存在する可能性が強く示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト由来の細胞のミトコンドリアや小胞体に MPIase ホモログが存在することを実証し、その精製、構造機能解析を通して未だに局在化機構が不明な TA タンパク質の選別輸送・膜挿入機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、精度よく細胞分画を進めることができ、MPIase ホモログを効率よく分離・精製できる細胞株を決定し、MPIase ホモログの精製条件を検討する。その際、ミトコンドリアの Tom5 や小胞体膜の Cyt b5 を基質として、これらの膜挿入活性を指標として MPIase ホモログの精製を進める。続いて、精製標品の NMR 分析や MS 分析を進め、MPIase ホモログの構造解析を行う。あわせて、精製標品を用いた機能解析も行う。さらに、膜貫通領域やそれに続く荷電領域を変化させたモデル基質膜タンパク質を構築し、細胞質領域によらない選別輸送・膜挿入の反応系を構築して、MPIase ホモログの機能解析を進める。

4. 研究成果

ヒト由来の細胞として HeLa 細胞と HEK293 細胞を用いて細胞分画、MPIase ホモログの抽出を行った。まず、両細胞を用いて細胞破碎・細胞分画の方法を検討した。細胞破碎法として、ホモジナイザー法、超音波法、圧力破碎法を試したところ、ホモジナイザー法で最もミトコンドリアと小胞体を精密に分画できた。また、HeLa 細胞の方がより精密に細胞分画が可能であった。そこで、HeLa 細胞を用い、ホモジナイザー法で細胞分画することにした。この条件で細胞破碎・抽出を行ったとき、MPIase ホモログの抽出効率ももっとも良好であった。

MPIase ホモログの抽出は、大腸菌の MPIase 抽出法

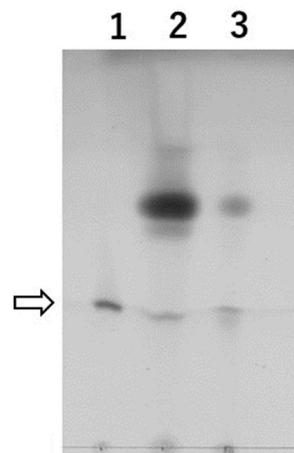


図 1 ミトコンドリア(レーン2)、小胞体(レーン3)の OG/TCA 抽出物の TLC 分析。精製大腸菌 MPIase をレーン1で解析した。MPIase の位置を矢印で示した。

(Nishiyama et al, *Nat Commun*, 2012) に倣って実施した。この方法では、まずミトコンドリアや小胞体をオクチルグルコシド(OG)で可溶化し、TCA(トリクロロ酢酸)処理した。大部分のタンパク質やその他高分子化合物は沈殿に回収されるが、MPIase は上清に回収される。上清画分をアセトン沈殿し、エーテル洗浄してリン脂質を除去した。この画分を TLC 分析すると、ミトコンドリア(図1、レーン2)、小胞体(レーン3)から大腸菌 MPIase(レーン1)と同じ位置の検出されるバンドが観察された。

まず、MPIase と同じ位置に検出されるバンドが MPIase ホモログであることを確認するため、ミトコンドリア抽出物を TLC で展開し、目的のバンドを TLC プレートからかき取って Tom5 の膜挿入活性を調べた。その結果、目的のバンドで効率の良い Tom5 の膜挿入活性が検出され(図2)、このバンドが MPIase ホモログであることが確認された。

これらの結果を基に、OG/TCA 上清画分を精製の出発試料として両 MPIase ホモログの精製を試みた。陰イオンカラムクロマトグラフィーや順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーを試したところ、ミトコンドリア、小胞体の両画分から SDS-PAGE 上で約 6 kDa のバンドが検出された(図3)。この 6 kDa のバンドの他にはほとんどバンドは検出されなかった。

上記精製 MPIase ホモログ標品を NMR 分析したところ、予想通り糖脂質であることが判明した。しかし、精製量・純度が不十分であったため、構造の決定までには至らなかった。

続いて、精製標品をリポソームに再構成し、機能解析を行った(図4)。その結果、Tom5 や Cyt b5 を基質に用いて膜挿入活性を測定すると、ミトコンドリア由来の抽出物を再構成したりリポソームでは Tom5 の(上段)、小胞体由来の抽出物を再構成した場合は Cyt b5 の(下段)強い膜挿入活性が検出された。これらの結果は、HeLa 細胞のミトコンドリアや小胞体にも MPIase に類似した機能をもつ糖脂質が存在し、これらが各オルガネラのタンパク質を膜挿入させるだけでなく、各オルガネラへの選別輸送にも関わっていることを強く示唆している。

Tom5 や Cyt b5 には細胞質領域が存在する。特に、Cyt b5 には長い細胞質領域が存在するため、局在化には細胞質領域が他のタンパク質との相互作用によって達成されている可能性が否定できない。そのため、細胞質領域を Tom5 のものに固定し、膜貫通領域、それに続く荷電領域を Tom5 と Cyt b5 のものに变化させた4つの変異体を構築した。これらをミトコンドリアや小胞体存在下で発現させて膜挿入活性を測定したところ、膜貫通領域の種類によらず C 末端の荷電領域の種類によりミトコンドリアや小胞体への選別輸送が規定されることが判明した。今後はこのモデルタンパク質を用いて機能解析を実施することにより、より精密に選別輸送を解析することができることが判明した。

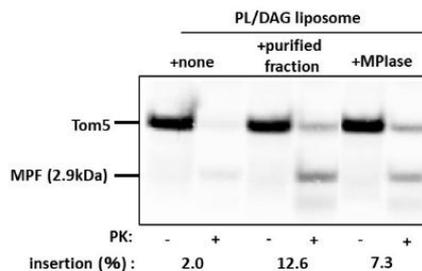


図2 ミトコンドリア抽出物からかき取った画分の Tom5 膜挿入活性。ミトコンドリア抽出物の MPIase と同一に展開されるバンドをかき取り、リポソームに再構成し Tom5 の膜挿入活性を測定した(+purified fraction)。対象として大腸菌 MPIase の活性(+MPIase)も示した。

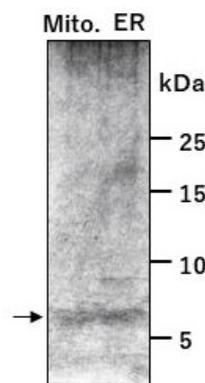


図3 精製 MPIase ホモログの SDS-PAGE、銀染色像。約 6 kDa のバンドを矢印で示した。

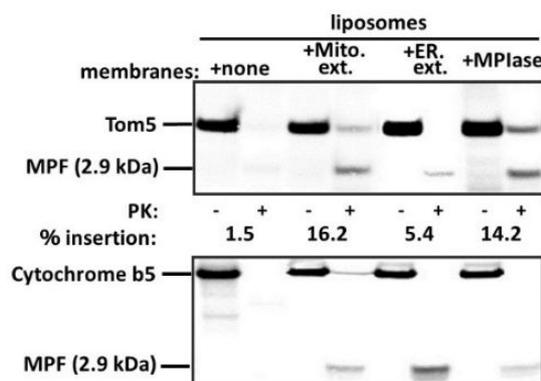


図3 精製 MPIase ホモログの膜挿入活性。上段では Tom5 の、下段では Cyt b5 の膜挿入活性を測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Mori Shoko, Nomura Kaoru, Fujikawa Kohki, Osawa Tsukiho, Shionyu Masafumi, Yoda Takao, Shirai Tsuyoshi, Tsuda Shugo, Yoshizawa-Kumagaye Kumiko, Masuda Shun, Nishio Hideki, Yoshiya Taku, Suzuki Sonomi, Muramoto Maki, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Intermolecular Interactions between a Membrane Protein and a Glycolipid Essential for Membrane Protein Integration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 609 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.1c00882	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 Nomura Kaoru, Mori Shoko, Fujikawa Kohki, Osawa Tsukiho, Tsuda Shugo, Yoshizawa-Kumagaye Kumiko, Masuda Shun, Nishio Hideki, Yoshiya Taku, Yoda Takao, Shionyu Masafumi, Shirai Tsuyoshi, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Role of a bacterial glycolipid in Sec-independent membrane protein insertion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-16304-1	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 Fujikawa Kohki, Han Youjung, Osawa Tsukiho, Mori Shoko, Nomura Kaoru, Muramoto Maki, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural Requirements of a Glycolipid MPLase for Membrane Protein Integration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202300437	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 Nishikawa Hanako, Sawasato Katsuhiro, Mori Shoko, Fujikawa Kohki, Nomura Kaoru, Shimamoto Keiko, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Interaction between glycolipid MPLase and proteinaceous factors during protein integration into the cytoplasmic membrane of E. coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 986602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2022.986602	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 Fujikawa Kohki, Mori Shoko, Nishiyama Ken-ichi, Shimamoto Keiko	4. 巻 81
2. 論文標題 A bacterial glycolipid essential for membrane protein integration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 95 ~ 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.accb.2022.09.005	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 Hikage Runa, Tadika Yuta, Asanuma Haruka, Han Youjung, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 721
2. 論文標題 MucA is a small peptide encoded by an overlapping sequence with cdsA that upregulates the biosynthesis of glycolipid MPlase in the cold	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 150148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.150148	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 Hikage Runa, Sekiya Yusei, Sawasato Katsuhiko, Nishiyama Ken ichi	4. 巻 29
2. 論文標題 CdsA, a CDP diacylglycerol synthase involved in phospholipid and glycolipid MPlase biosynthesis, possesses multiple initiation codons	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 347 ~ 355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13104	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 Kamemoto Yuki, Hikage Runa, Han Youjung, Sekiya Yusei, Sawasato Katsuhiko, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 370
2. 論文標題 Coordinated upregulation of two CDP-diacylglycerol synthases, YnbB and CdsA, is essential for cell growth and membrane protein export in the cold	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEMS Microbiology Letters	6. 最初と最後の頁 fnad131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/femsle/fnad131	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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古谷 萩、沢里 克宏、森 祥子、藤川 紘樹、島本 啓子、西山 賢一
2. 発表標題 大腸菌生体膜由来の生体膜保護物質の同定とその構造機能解析
3. 学会等名 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澁谷 まゆ、Han Youjung、大澤 月穂、藤川 紘樹、島本 啓子、西山 賢一
2. 発表標題 MPase生合成酵素の探索
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古谷 萩、沢里 克宏、森 祥子、藤川 紘樹、島本 啓子、西山 賢一
2. 発表標題 大腸菌生体膜由来の膜保護物質の同定と構造機能解析
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡会 未夢、古谷 萩、Wiriyasemkul Pattama、永森 収志、西山 賢一
2. 発表標題 生体膜保護物質（BPF）の同定・構造機能解析
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 波知、西川 華子、西山 賢一
2. 発表標題 膜タンパク質の膜挿入と複合体形成におけるMPlase の機能
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Han Youjung、藤川 紘樹、大澤 月穂、村本 真規、島本 啓子、西山 賢一
2. 発表標題 タンパク質の膜挿入反応を触媒する糖脂質MPlaseの構造・機能解析
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 樹南、森 祥子、藤川 紘樹、島本 啓子、西山 賢一
2. 発表標題 膜挿入基質タンパク質GFP-Tom5の精製
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日景 瑠那、Wiriyasemkul Pattama、永森 収志、西山 賢一
2. 発表標題 真核生物のMPlase (Membrane protein integrase) ホモログの探索
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川 華子、西山 賢一
2. 発表標題 TAT (Twin-Arginine Translocation) 膜透過反応の分子機構解析
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山 賢一
2. 発表標題 膜タンパク質のバイオジェネシスに関する糖脂質MPlaseの構造と機能
3. 学会等名 第3回細胞形成研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Han Youjung、藤川 紘樹、大澤 月穂、村本 真規、島本 啓子、西山 賢一
2. 発表標題 タンパク質の膜挿入反応を触媒する糖脂質MPlaseの構造・機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日景 瑠那、Pattama Wiriyasemkul、永森 收志、西山 賢一
2. 発表標題 ヒト細胞を用いた真核生物のタンパク質膜挿入因子 MPlaseホモログの探索
3. 学会等名 第8回 デザイン生命工学研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岩手大学農学部応用生物化学科分子生物学研究室
<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~sec/>

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
研究分担者	永森 收志 (Nagamori Shushi) (90467572)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

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