

未知の膜タンパク質挿入装置の解明

Elucidation of a novel membrane insertion system

(日本生化学会推薦)

代表研究者	神戸大学	匂坂 敏朗	Kobe University	Toshiaki SAKISAKA
協同研究者	神戸大学	山本 泰憲	Kobe University	Yasunori YAMAMOTO

Transmembrane proteins are cotranslationally or posttranslationally inserted into the endoplasmic reticulum (ER) membrane. We have identified calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) as a mammal-specific membrane insertion receptor for the transmembrane protein having a transmembrane domain close to the C-terminus. After or simultaneously with the membrane insertion into the ER, sorting of the transmembrane proteins occurs at the ER and allows transport of the transmembrane proteins to the destined organelle. Here, we have found that the number of transmembrane domains is involved in determining its ER or *cis*-golgi localization. A transmembrane protein containing four transmembrane domains at the C-terminus mainly localizes at the *cis*-golgi, while a transmembrane protein containing less than four transmembrane domains at the C-terminus mainly localizes at the ER. We generated a truncated protein containing only four transmembrane domains and found that the truncated protein mainly localized at the *cis*-golgi. We purified and identified a small G protein as a four transmembrane domains-binding protein using the cell line stably expressing the truncated protein containing only four transmembrane domains. These results suggest that the number of transmembrane domains at the C-terminus is important for determining the transmembrane protein localization at the ER and *cis*-golgi interface.

研究目的

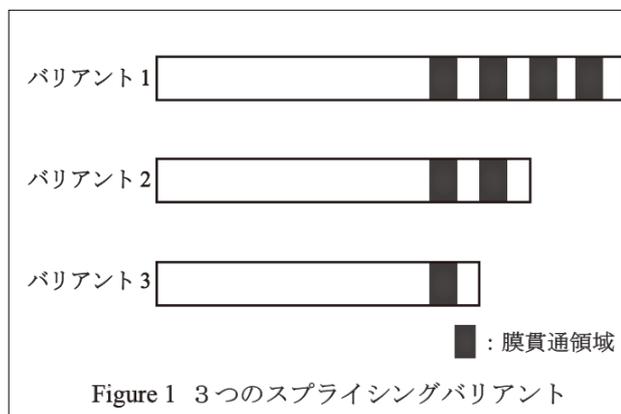
すべての生物は総タンパク質の約 30%に及ぶ膜タンパク質を有し、物質輸送、細胞内シグナル伝達、生体防御などの生体に必須な機能を担っている。疎水性ドメインを持つ膜タンパク質がどのようにして脂質二重層へ正確にターゲティングされ、挿入されるのかを理解することは、生化学の重要な課題の一つである。膜タンパク質の生合成メカニズムとして膜透過装置トランスロコンによる翻訳と共役した経路がある。リボソームで合成された膜タンパク質は、各々適切な膜へ輸送される必要があり、小胞体に存在する膜透過装置であるトランスロコンを介して、小胞体膜に挿入される。そして小胞

輸送を介し、目的の場所へと輸送される。しかし、トランスロコンは、大多数の膜タンパク質の膜挿入を担う優れたシステムであるが、トランスロコンだけでは小胞体への膜挿入を説明できない膜タンパク質も存在する。その一つとして、C 末端側に膜貫通領域がある膜タンパク質がある。C 末端側に膜貫通領域がある膜タンパク質は、膜貫通領域がリボソームの外へ出てくる前に翻訳が終了するため、トランスロコンによる翻訳と共役した膜挿入が物理的に不可能である。小胞体に膜挿入された C 末端側に膜貫通領域がある膜タンパク質は、他の膜タンパク質と同様に、小胞輸送を介し、目的の場所へと輸送され

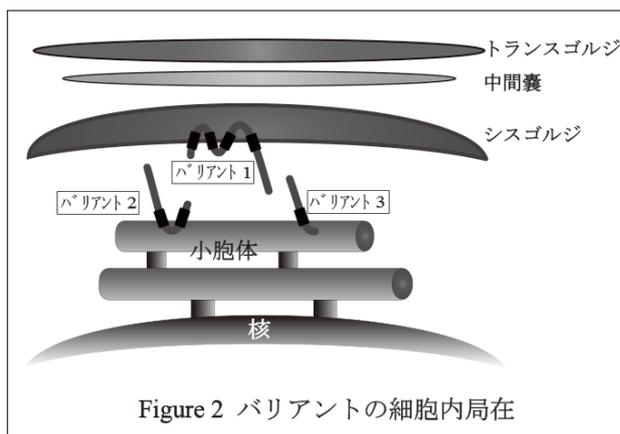
る。その輸送の選別は小胞体で行われることが知られているが、膜貫通領域が輸送選別に関与しているかは十分に明らかにされていない。そこで、C 末端側の膜貫通領域の個数を変えることにより、小胞体への膜挿入、その後の輸送に影響があるかを調べた。

研究経過

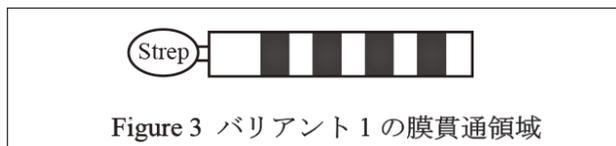
C 末端側に膜貫通領域がある膜タンパク質の細胞内局在を調べた。この膜タンパク質には 3 種のスプライシングバリエントがあり、それぞれ膜貫通領域の個数が 4 個 (バリエント 1)、2 個 (バリエント 2)、1 個 (バリエント 3) であった (Figure 1)。



HeLa 細胞に HA (ヘマグルチニンのペプチド配列) タグのついたバリエント 3 種 (HA-バリエント 1、HA-バリエント 2、HA-バリエント 3) をそれぞれ発現させ、抗 HA 抗体と抗細胞内小器官のマーカータンパク質抗体を用いて免疫染色した。HA-バリエント 1 はシスゴルジのマーカータンパク質である GM130(シスゴルジマトリックスタンパク質 130)と共局在した。HA-バリエント 2 と HA-バリエント 3 は小胞体のマーカータンパク質である PDI(タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ)と共局在した。これらことから、膜貫通領域が 4 つ存在するバリエントはシスゴルジに局在し、膜貫通領域が 4 つ有しないものは小胞体に局在することが分かった。膜貫通領域のスプライシングが、シスゴルジと小胞体への選別を行っていることが考えられた (Figure 2)。



バリエント 1 のシスゴルジへの局在に必要な領域が C 末 4 つの膜貫通領域で十分であるか調べるために、strep タグを付けたバリエント 1 の 4 つの膜貫通領域(strep-バリエント 1 膜貫通領域)を作製した (Figure 3)。



これを安定に発現する HeLa 細胞を樹立し(strep-バリエント 1 膜貫通領域-HeLa 細胞)、抗 strep 抗体、抗 GM130 抗体で免疫染色を行った。strep-バリエント 1 膜貫通領域は GM130 と共局在した。このことから、バリエント 1 のシスゴルジへの局在には 4 つの膜貫通領域のみで十分であることが分かった。C 末端側にある膜貫通領域の個数を変えることにより、その長さに依存して細胞内局在が異なっていた。膜貫通領域の長さによる疎水性の変化が、小胞体膜の脂質二重層との相互作用を介して、小胞体での選別輸送に関与していると考えられた。

バリエント 1 をシスゴルジへ局在化させる分子メカニズムを明らかにするために、C 末 4 つの膜貫通領域に結合するタンパク質の探索を行った。strep-バリエント 1 膜貫通領域-HeLa 細胞の細胞抽出液から Strep-Tactin Sepharose を用いて strep-バリエント 1 膜貫通領域をプルダウンしたサンプルを電気泳動し、銀染色した。Strep-バリエント 1 膜貫通領域と共に 2 つのタンパク質がプルダウンされた。そのうちの 1 つがシスゴルジに局在することが知られている低分子量 G タンパク質であった。この低分子量 G タンパク質が膜貫通領域に結合することにより、バリエン

ト1のシスゴルジへの局在に関与していると考えられた。

考察

本研究で解析したC末端側に膜貫通領域がある膜タンパク質は、スプライシングにより膜貫通領域の数を変化させることにより、細胞内局在（小胞体あるいはシスゴルジ）を変化させることができる膜タンパク質であることが明らかになった。

バリエーション1がシスゴルジへ局在化するには、バリエーション1が小胞体から輸送され、その後シスゴルジに到達したバリエーション1がゴルジ中間嚢へ輸送されない、またシスゴルジに到達したバリエーション1が小胞体へ返送されない、の少なくともこれら3つの条件が同時に起こることが必要であると考えられる。これらのどの過程にバリエーション1の4つの膜貫通領域に結合する低分子量Gタンパク質が関与しているかは不明である。低分子量Gタンパク質がシスゴルジに局在していることが知られており、そこでバリエーション1と結合していると考えられる。低分子量Gタンパク質とバリエーション1の結合が、バリエーション1をシスゴルジからゴルジ中間嚢へ輸送あるいはシスゴルジから小胞体へ返送を止めている可能性が高いと考えられる。

今回発見した低分子量Gタンパク質は供与膜からの輸送小胞の形成と標的膜への輸送を制御し、小胞体—ゴルジ体間、ゴルジ体—エンドソーム間、エンドソーム—細胞膜間の小胞輸送を制御していることが知られている。今回の結果は、低分子量Gタンパク質がシスゴルジからの小胞輸送ではなく、シスゴルジでの膜タンパク質の局在化を制御していることを強く示唆している。低分子量Gタンパク質はシスゴルジに局在する全ての膜タンパク質の局在化を制御しているのか、あるいは特定の配列を持つ膜タンパク質の局在を特異的に制御しているのかは不明である。本研究で解析したC末端側に膜貫通領域がある膜タンパク質のシスゴルジへの局在化にはC末端の4つの膜貫通領域で十分であることから、この領域内に低分子量Gタンパク質が認識する特異的配列

があり、局在化シグナル配列として機能していると考えられる。今後はC末端の4つの膜貫通領域と低分子量Gタンパク質の結合をより詳細に解析して認識配列を明らかにし、その配列とこれまで報告されているシスゴルジ局在配列と比較、検討する予定である。

本研究で解析したC末端側に膜貫通領域がある膜タンパク質の機能、特に細胞質領域の機能を明らかにする必要があると考えている。細胞、組織によって各スプライシングバリエーションの発現パターンに違いがあるのか、スプライシングによるシスゴルジと小胞体の局在変化の意味は何かを追求していきたいと考えている。

本研究成果は、膜貫通領域の数による膜タンパク質の局在化機構の一つを発見し、低分子量Gタンパク質が関与する新しい膜タンパク質のシスゴルジへの局在化機構の存在を示唆しており、現代生化学、細胞生物学の中心的課題の一つである膜タンパク質の局在化機構の分子メカニズムの解明に寄与すると考えている。

研究の発表

口頭発表

1. 匂坂敏朗、寺島俊雄：髄鞘低形成と皮質形成異常を示す新規突然変異マウス *laggard*、第121回日本解剖学会総会・全国学術集会、福島、2016年3月29日

誌上発表

1. Y. Yamamoto, and T. Sakisaka: The Emerging Role of Calcium-modulating Cyclophilin Ligand(CAML) in Posttranslational Insertion of Tail-anchored Proteins into the Endoplasmic Reticulum Membrane. *J. Biochem.*, 157(6): 419-429, 2015.
2. Y. Fujiwara, N. Goda, T. Tamashiro, H. Narita, K. Satomura, T. Tenno, A. Nakagawa, M. Oda, M. Suzuki, T. Sakisaka, Y. Takai, and H. Hiroaki: Crystal structure of afadin PDZ domain-nectin-3 complex shows the structural plasticity of the ligand-binding site. *Protein Sci.*, 224: 376-385, 2015.

3. T. Urade, Y. Yamamoto, X. Zhang, Y. Ku, and T. Sakisaka: Identification and Characterization of TMEM33 as a Reticulon-binding Protein. *Kobe J. Med. Sci.*, 60:57-65, 2014.