

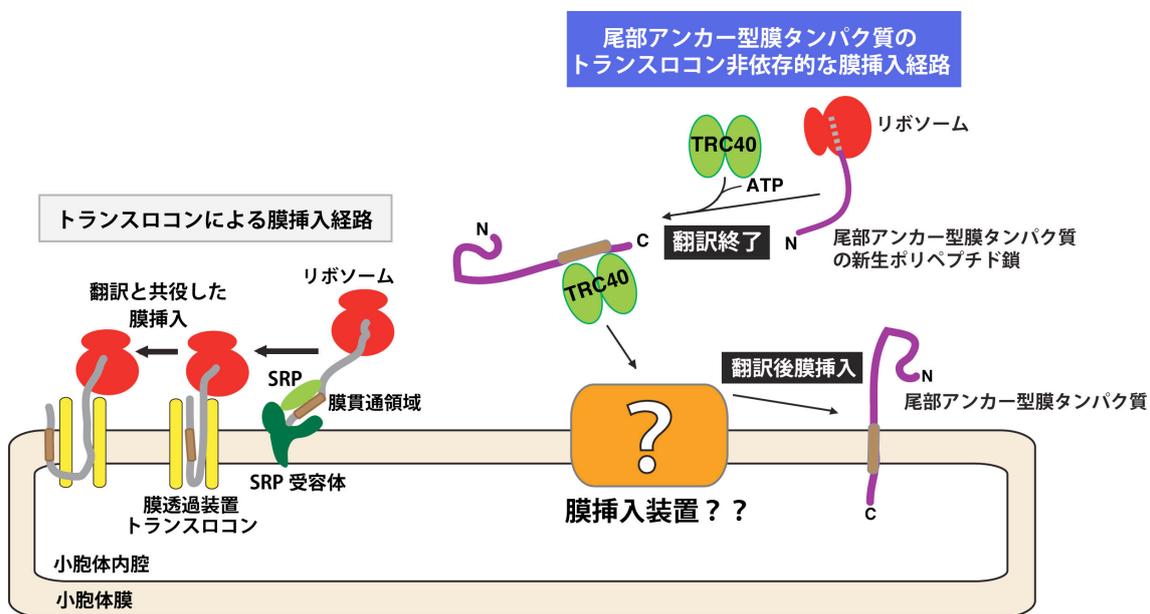
「尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜挿入の分子メカニズムの解明」

神戸大学大学院医学研究科 生理学・細胞生物学講座 膜動態学分野 山本 泰憲

1 研究の背景と目的

真核細胞は多種多様な膜タンパク質を小胞体膜に挿入し、分泌経路を使って適切に配置することで生命活動を行っている。最も主要な膜タンパク質の小胞体膜挿入システムとして、シグナル認識粒子(SRP)、SRP 受容体、および膜透過装置トランスロコンによる翻訳と共役した膜挿入経路がある(図1)。しかしながらすべての膜タンパク質がトランスロコンを利用できるわけではない。尾部アンカー型膜タンパク質とはC末端に1つの膜貫通領域を持ち、N末端が細胞質側に面している膜タンパク質の一群を指し、膜輸送、脂質合成、オルガネラ生合成、タンパク質の品質管理などの様々な重要な機能を担っている。尾部アンカー型膜タンパク質は膜貫通領域(シグナル配列)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小胞体膜への挿入が物理的に不可能であり、必然的に翻訳後に膜挿入されることになる(図1)。

哺乳動物細胞では、細胞質に局在する ATPase である TRC40(transmembrane domain recognition complex of 40 kDa)が翻訳終了直後の尾部アンカー型膜タンパク質の膜貫通領域を認識し、小胞体へリクルートする(図1)。しかしながら、その後の膜挿入過程については不明な点が極めて多く、とりわけ膜挿入装置は長年の間不明のままであった(図1)。そこで本研究では、哺乳動物細胞の小胞体における尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入装置の分子実態の解明を行った。



(図1) トランスロコンによる膜挿入経路と尾部アンカー型膜タンパク質のトランスロコン非依存的な膜挿入経路

2 研究方法・研究内容

哺乳動物細胞の小胞体における尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入機構を明らかにするため、TRC40 に結合する小胞体膜タンパク質の同定をアフィニティークロマトグラフィー法で試みた。GST-TRC40 を固相化したカラムに豚脳の Triton X-100 抽出液をアプライし、精製されたタンパク質を質量分析により同定した。その結果、TRC40 に結合

する分子量 38 kDa のタンパク質として calcium-modulating cyclophilin ligand (CAML) を同定した。CAML はもともとは T 細胞受容体シグナル伝達を制御する小胞体膜タンパク質として単離された分子であるが、臓器普遍的に発現しており、普遍的な小胞体膜タンパク質としての CAML の生理機能については不明のままであった。そこで CAML に着目し、CAML の尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入における役割について検討を行った。

CAML と TRC40 との結合を HEK293 細胞を用いた共免疫沈降法と免疫染色法により検討したところ、CAML は N 末細胞質領域で TRC40 と結合し、小胞体膜上の TRC40 受容体として機能することが明らかとなった。

CAML と TRC40 の結合が尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜への翻訳後膜挿入に与える影響を調べた。N 末端に FLAG タグ、C 末端に opsin タグ (糖鎖付加配列) を導入した尾部アンカー型膜タンパク質である Sec61 β (F-Sec61 β -op) をウサギ網状赤血球抽出液を用いて *in vitro* 翻訳し、シクロヘキシミドで翻訳反応を停止後、イヌ臍臓由来マイクロソームとインキュベーションすると、F-Sec61 β -op が小胞体膜に挿入され糖鎖付加された。この反応に CAML の細胞質領域の組み換えタンパク質を添加すると、F-Sec61 β -op の糖鎖付加が顕著に低下したことから、CAML と TRC40 の結合は尾部アンカー型膜タンパク質の小胞体膜への翻訳後膜挿入に重要な働きをしていることが明らかとなった。次に、CAML が膜挿入に対するポジティブな因子なのかあるいはネガティブな因子なのかを調べるために、CAML を siRNA ノックダウンした HEK293 細胞由来の小胞体膜を用いて同様に F-Sec61 β -op の翻訳後膜挿入を検討した。コントロールの HEK293 細胞に比べ、CAML をノックダウンした HEK293 細胞では F-Sec61 β -op の糖鎖付加が顕著に低下した。他方、TRC40 非依存的な膜タンパク質である cytochrome b5 の膜挿入には影響を与えなかった。従って、CAML は TRC40 による尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入をポジティブに制御する因子であることが明らかとなった。

CAML による膜挿入制御機構をさらに詳しく理解するために、CAML 分子複合体の単離、同定を行った。FLAG タグを付加した CAML を安定に発現する HEK293 細胞株を樹立し、その細胞抽出液より抗 FLAG 抗体固相化レジンを用いて CAML 分子複合体を精製し、質量分析で解析したところ、TRC40 に加え、新たに WRB (tryptophan-rich basic protein) が同定された。WRB の siRNA ノックダウンにより、尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入が減弱することを確認した。CAML と WRB の結合を共免疫沈降法により検討したところ、CAML は C 末膜貫通領域で WRB と結合していた。

つぎに尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入における CAML と WRB の結合の役割を調べた。CAML あるいは WRB を単独で過剰発現させた HEK293 細胞では、内在性の TRC40 の作用が阻害され、F-Sec61 β -op の小胞体への膜挿入が低下した。これらの抑制効果は、CAML と WRB の両方を過剰発現させることで完全に消失した。以上のことから、CAML と WRB は小胞体膜上で TRC40 受容体複合体を形成し、協調的に尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入を行っていることが明らかになった。

CAML、WRB、TRC40 間の 3 者の結合関係を検討した。HeLa 細胞に WRB と TRC40 を過剰発現すると、TRC40 が WRB の局在する小胞体膜にリクルートされた。これに CAML の細胞質領域のみのフラグメント (CAML-N) を過剰発現すると、TRC40 の小胞体へのリクルートが阻害された。また、CAML-N、WRB の細胞質 coiled-coil ドメイン (WRB-CC)、および TRC40 の組み換えタンパク質をそれぞれ大腸菌で発現、精製し、3 者の結合を生化学的に試験管内で検討したところ、WRB-CC は CAML-N と TRC40 の結合を dose-dependent に阻害し、代わって WRB-CC が TRC40 に結合していた。以上の結果から、CAML と WRB は競合的に TRC40 と結合することが明らかとなった。

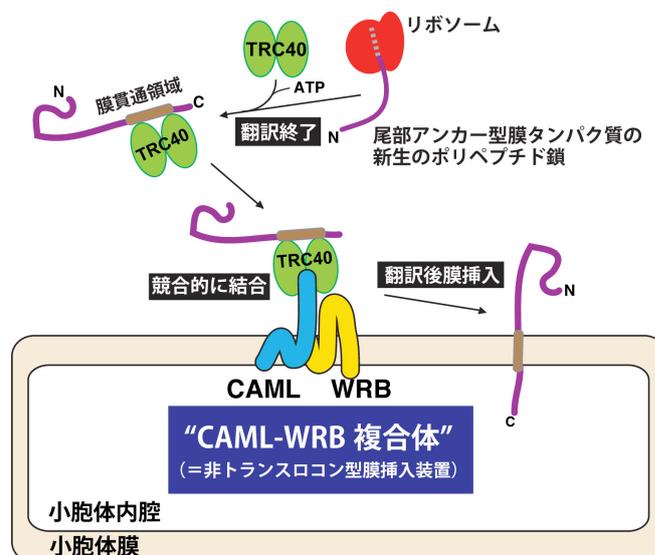
CAML は細胞質領域の N 末付近に進化的に高度に保存された塩基性アミノ酸のクラスター

一(RRRK)を有しており。このRRRKを酸性アミノ酸であるグルタミン酸に置換した変異体(CAML-EEEE)はTRC40との結合能を完全に消失したことから、この保存された塩基性アミノ酸クラスター領域がTRC40との結合に重要な働きをしていることが明らかになった。CAML-EEEE変異体は小胞体への局在およびWRBとの結合能には全く影響がないため、これを用いて、尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入におけるCAMLとWRBのTRC40への競合的な結合の役割を調べた。上述のごとく、WRBを単独で過剰発現させたHEK293細胞では、内在性のTRC40の作用が阻害されてF-Sec61 β -opの小胞体への膜挿入が低下する一方、この膜挿入低下はCAMLとWRBの両方を過剰発現させることで完全に回復される。ところが、CAML-EEEEとWRBの両方を過剰発現させたHEK293細胞では、その回復効果はCAMLとWRBの共発現に比べて著しく低かった。したがってTRC40のWRBへの結合だけでは不十分であり、TRC40のCAML-WRB複合体への競合的な結合が尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入に必須であることが明らかとなった。

3 研究成果

以上の結果より、長年不明であった哺乳動物細胞の小胞体における尾部アンカー型膜タンパク質の翻訳後膜挿入を担う膜挿入装置の分子実態が、CAMLとWRBという2種のTRC40受容体からなる分子複合体であることが明らかとなった(図2)。さらに膜挿入にはCAMLとWRBの競合的なTRC40への結合が必要であることを明らかにした。

しなしながら、CAML-WRB複合体が実際にどのような機序でTRC40を受け取るのか? TRC40とCAML、WRBの競合的な結合は膜挿入プロセスにおいてどのような役割をしているのか? CAML-WRB複合体はどのような駆動機構で脂質膜構造を制御し、翻訳後に尾部アンカー型膜タンパク質を膜挿入するか? 膜挿入プロセスにおけるTRC40のATPase活性の役割は何か? などについては今のところ不明である。これを明らかにするためには今後、人工膜による試験管内再構成系を用いたCAML-WRB複合体の機能解析や構造解析が必要であると考えられる。



(図2) 哺乳動物細胞の小胞体における尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入装置 CAML-WRB 複合体の発見

下等真核生物である酵母では尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入経路としてGET(guided entry of tail-anchored proteins)経路が同定されている。GET経路の膜挿入

装置は GET1、GET2、GET3 から構成され、アミノ酸配列の相同性から、GET3 は TRC40 のホモログであり、GET1 は WRB のホモログである一方、GET2 は CAML のホモログではない。CAML は哺乳動物、鳥類、両生類、魚類など脊椎動物で高度に保存された遺伝子である。したがって、CAML-WRB 複合体による尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入経路は広く脊椎動物間で保存された経路である可能性が高い。他方、脊椎動物は進化の過程で何故、膜挿入装置に GET2 ではなく CAML を必要としたのであろうか？進化の過程で高次生命機能を獲得するために CAML が必要となった可能性が考えられるが、現時点で不明である。CAML はもともとヒト免疫細胞の活性化を調節するシグナル伝達因子として同定された遺伝子であり、その後、免疫系のみならず胚発生、神経伝達、血管収縮における様々なシグナル伝達を調節していることが報告されている。CAML に結合してシグナル伝達を制御する分子として、EGF 受容体、p56^{lck}、TACI、ATRAP、GABA_A 受容体等が報告されているが、これらの高次生命機能を制御するシグナル伝達分子が尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入経路に関与しているのか？は今後検討すべき課題である。今回の膜挿入装置としての CAML の発見をきっかけに、膜挿入制御と高次生命機能との間の未知の機能関係の存在が明らかになる可能性がある

4 生活や産業への貢献および波及効果

上述のごとく、本研究では哺乳動物細胞の小胞体における尾部アンカー型膜タンパク質の膜挿入装置として CAML-WRB 複合体を世界に先駆けて発見した。他方、CAML はもともと免疫細胞の活性化を調節するシグナル伝達因子として同定された遺伝子であり、WRB はダウン症に伴う心臓奇形に関係する染色体領域に存在する遺伝子として知られている。従って、CAML-WRB 複合体の生理機能の解析を今後推し進めることで、免疫不全症やダウン症の発症のメカニズムについて新しい知見が得られる可能性があり、膜挿入を作用点とする創薬につながることを期待できる。従って本研究の波及効果は学術的のみならず、医学的にも極めて大きいと考えている。

薬の約 60% は何らかの膜タンパク質を標的としているため、膜タンパク質-プロテオリポソームの医学上の有用性が盛んに指摘されているが、完全にフォールディングした膜タンパク質をいかにして人工膜に埋め込むか？という作製の技術的困難さが大きな障害である。本研究で明らかにした CAML-WRB 複合体の駆動機構の解析を推し進め、翻訳後膜挿入原理を解明することで、膜タンパク質を自在に人工膜に埋め込む技術の開発に繋がる可能性がある。この技術を医学・医療で重要な膜タンパク質に適用し、プロテオリポソームを用いた薬物スクリーニング、バイオセンサー診断法、薬物送達など次世代創薬、診断ツールの開発につながると期待できる。従って本研究の波及効果は産業的にも極めて大きいと考えている。