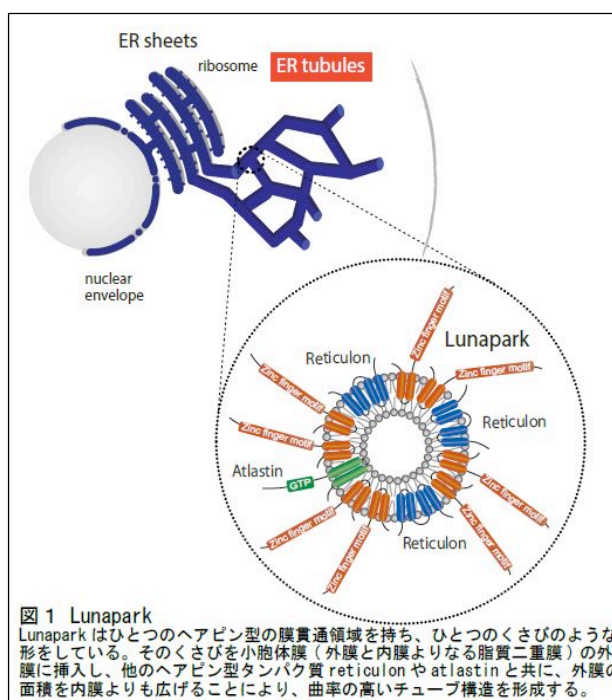


# ヘアピン型タンパク質の膜挿入装置の同定と膜挿入病

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  
匂坂 敏朗

## 1. 目的

すべての生物の構成単位は細胞であり、その細胞を取り囲んでいるのが膜である。細胞内に存在する構造物、細胞小器官（オルガネラ）は、ほとんどが膜で包まれている。それぞれのオルガネラに局在化した膜タンパク質群の協調作用により、独自の構造が形成され、独自の機能が発揮される。したがって、膜タンパク質の膜への正確なターゲティングと挿入の機構解明は、生命現象の根幹に迫るきわめて重要な課題である。ヘアピン型タンパク質である lunapark, reticulon, atlastin は小胞体のチューブ構造の形成に関わることが知られている。Lunapark は小胞体チューブ構造の three-way junction 上に存在し、reticulon, atlastin と相互作用することで、小胞体ネットワーク形成に重要な働きをする(図1)<sup>1)</sup>。広く知られている膜挿入装置としてトランスロコンがあるが、ヘアピン型タンパク質の膜挿入のメカニズムは不明である。そこで本研究では、lunapark の膜挿入装置の単離、同定をおこなうことを目的とした。



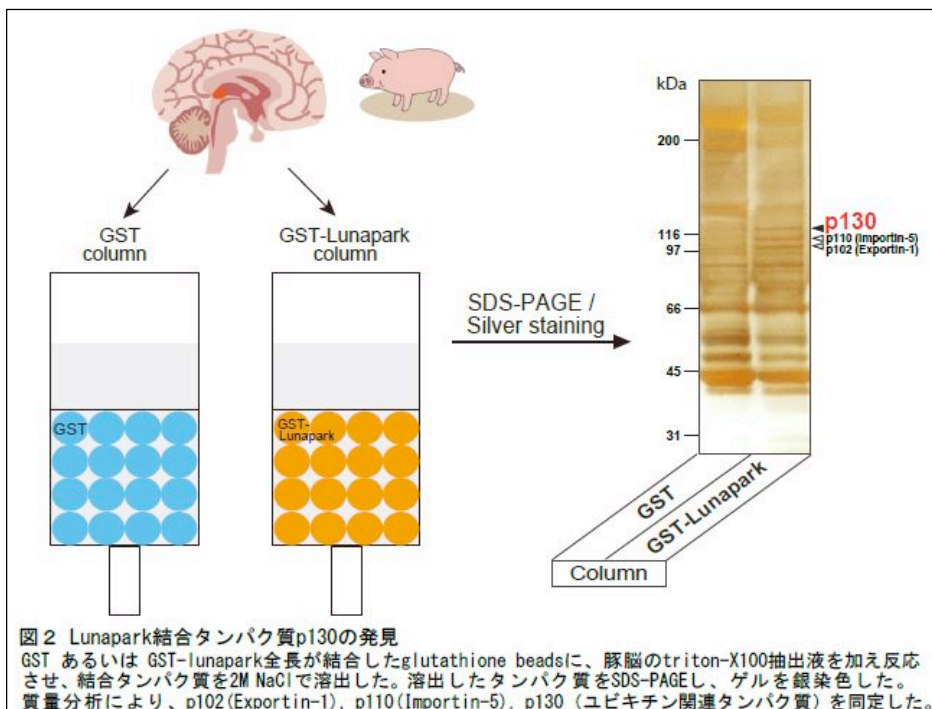
## 2. 方法

アフィニティークロマトグラフィー：GST-lunapark全長あるいはGSTを大腸菌に発現させ、glutathione sepharose 4Bに結合したものを用意する。豚脳を1% Triton X-100を含むbufferを用いて細胞抽出液を作成した。その豚脳抽出液にglutathione sepharose 4Bを加え、内在性のGSTタンパク質をあらかじめ除去し、GST-lunaparkが結合したglutathione sepharose 4BあるいはGSTが結合したglutathione sepharose 4Bを加え、オーバーナイトでインキュベートした。その後、glutathione sepharose 4Bをよく洗い、SDSサンプルbufferを用いて結合タンパク質を溶出した。溶出したサンプルをSDS-PAGEし、そのゲルを銀染色した。目的バンドをゲルから切り出し、trypsin処理し、質量分析を行い、タンパク質を同定した。

免疫沈降実験：HEK293細胞に目的タンパク質の発現ベクターをトランスフェクションし、0.5% Triton X-100を含むbufferを用いて細胞抽出液を作成した。その細胞抽出液を、FLAG抗体あるいはHA抗体を用いて免疫沈降を行った。SDSサンプルbufferを用いて免疫沈降タンパク質を溶出した。溶出したサンプルをSDS-PAGEし、そのゲルをメンブレンに転写した。転写されたメンブレンを5% スキムミルク/TBS-Tでブロッキングし、一次抗体、二次抗体をそれぞれ反応させた。その後化学発光させ、LAS-4000で検出した。

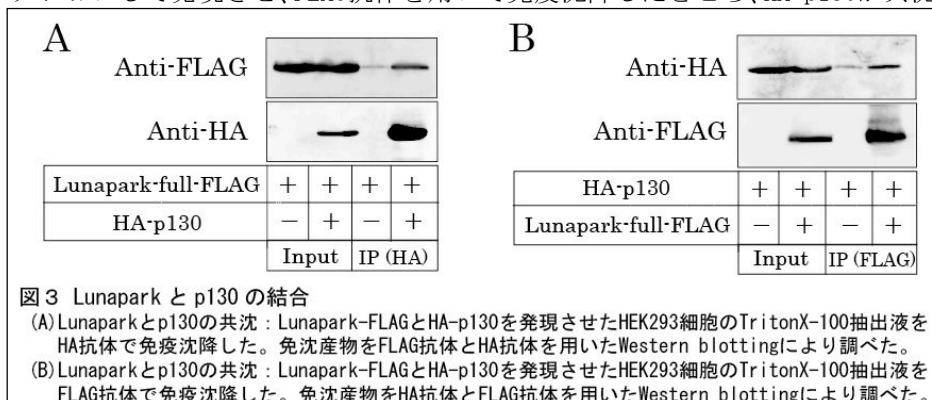
## 3. 結果

Lunaparkは、N末端側に2つの膜貫通領域とC末端側にzinc fingerを持つ膜タンパク質である。このようなダンベル形をした膜貫通領域をもつヘアピン型タンパク質がトランスロコンによる小胞体への膜挿入が可能であるかは不明である。これまで、非トランスロコン型膜挿入装置の分子実体は不明のままであったが、私共は、テイルアンカー型タンパク質の膜挿入装置としてCAML-WRB複合体を発見することに成功している<sup>2)</sup>。そこで、同様な方法を用いて、lunapark に結合するタンパク質を探索することにより、新しい膜挿入装置の発見を目指した。大腸菌に発現させたGST-lunapark全長が結合したglutathione beadsあるいはコントロールとしてGSTが結合したglutathione beadsに、豚脳のtriton-X100抽出液を加え反応させた。結合したタンパク質をSDS-PAGEし、ゲルを銀染色した。130kDa、110kDa、102kDaの大きさのバンドが、GST-lunaparkカラム特異的に認められた(図2)。



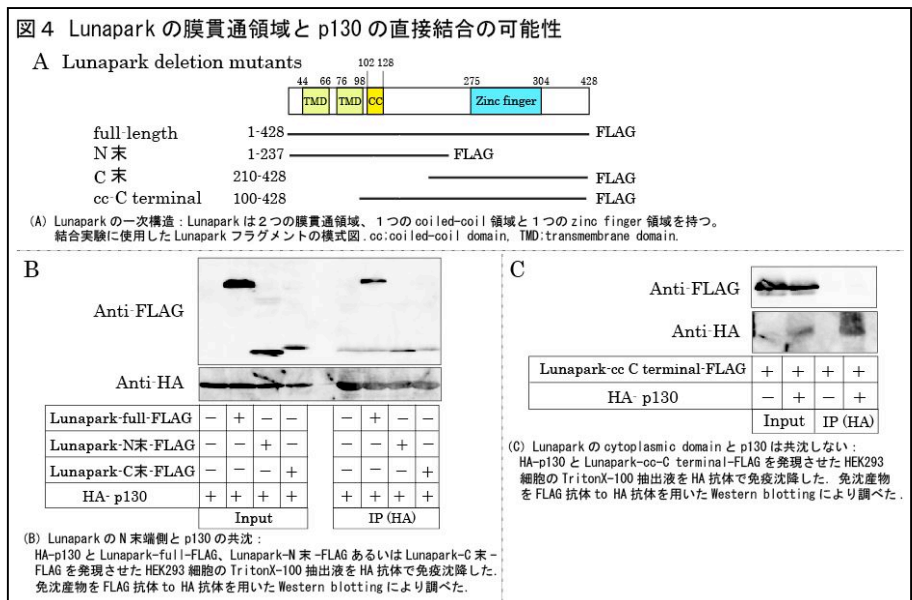
質量分析の結果、110kDa のタンパク質はimportin-5、102kDaのタンパク質はexportin-1であった。130kDaのタンパク質は、ユビキチン化を調節するタンパク質であり、ユビキチン化を受ける基質の交換促進に関与することが報告されている。本研究報告書では、研究の新規性を保つために、130kDa のタンパク質はp130とする。

Lunapark-FLAGとHA-p130と一緒にHEK293細胞にトランスフェクションして発現させ、HA抗体を用いて免疫沈降したところ、lunapark-FLAGが共沈した(図3A)。Lunapark-FLAGとHA-p130と一緒にHEK293細胞にトランスフェクションして発現させ、FLAG抗体を用いて免疫沈降したところ、HA-p130が共沈した(図3B)。



これらの結果から、lunaparkがp130と結合することが明らかになった。

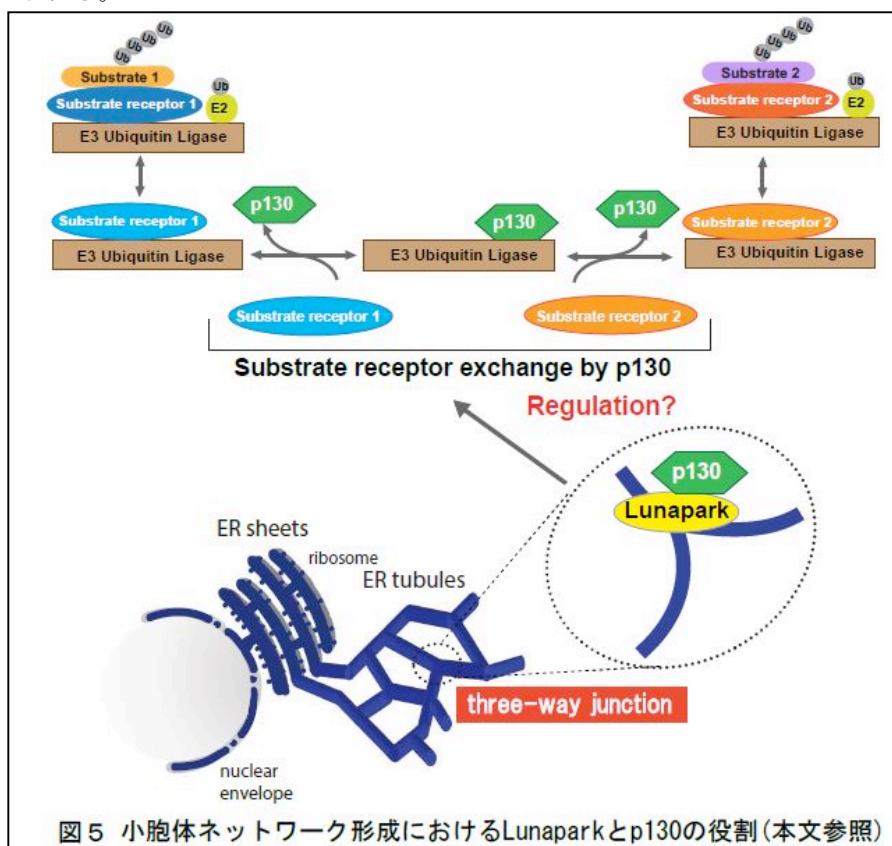
Lunaparkとp130の結合を詳細に検討した。LunaparkのN末の膜貫通領域を含む領域、C末のzinc fingerを含む領域、coiled-coilとzinc fingerを含む細胞質領域の3つのフラグメントを作成した(図4A)。HA-p130と共にLunaparkのフラグメントをHEK293細胞にトランスフェクションして発現させ、HA抗体を用いて免疫沈降したところ、N末の膜貫通領域を含むフラグメントが共沈した(図4B)。Coiled-coilとzinc fingerを含む細胞質領域のフラグメントは共沈しなかった(図4C)。



これらの結果から、LunaparkはN末の膜貫通領域を介してp130に結合することが明らかになった。

#### 4. 考察

今回の結果により、p130がLunaparkに結合し、小胞体膜上においてユビキチン化を調節している可能性を示した。ユビキチン化を受ける基質はその受容体が結合したE3 ユビキチンリガーゼの複合体に結合する。E2ユビキチン結合酵素も同時にE3 ユビキチンリガーゼに結合する。そして基質のユビキチン化が促進する。ユビキチン化終了後、ユビキチン化を受けた基質とE2ユビキチン結合酵素がE3 ユビキチンリガーゼから解離し、基質受容体のみがE3 ユビキチンリガーゼに結合した状態になる。p130がE3 ユビキチンリガーゼに結合することにより、基質受容体が外れる。そして、新たな基質受容体がE3 ユビキチンリガーゼに結合することにより、p130が外れる。その後、基質受容体に合う新たな基質が結合し、基質のユビキチン化が促進する。このようにp130が基質の交換を促進し、多くの基質がユビキチン化されることになる(図5)。小胞体膜上にあるLunaparkがp130に結合することにより、このp130による基質交換反応の活性を調節する可能性が示唆された。Lunaparkが小胞体チューブ構造のthree-way junction上に局在し、小胞体チューブネットワーク形成に重要な働きをすることが知られている。Lunaparkはその膜貫通領域を介して小胞体チューブ構造のthree-way junctionの構造維持に働くのみでなく、小胞体ネットワーク形成に必要なタンパク質、reticulonやatlastinなどをユビキチン化することにより、タンパク量を調節し、適切な量のreticulonやatlastinを維持することにより、小胞体チューブネットワーク形成に寄与すると考えられる。



#### 5. 参考文献

- 1) Chen, S., Novick, P., & Ferro-Novick, S.: ER network formation requires a balance of the dynamin-like GTPase Seylp and the Lunapark family member Lnp1p. *Nat. Cell Biol.*, **14**(7):707-716, 2012
- 2) Yamamoto, Y. & Sakisaka, T.: Molecular machinery for insertion of tail-anchored membrane proteins into the endoplasmic reticulum membrane in mammalian cells. *Molecular Cell*, **48**:387-97, 2012