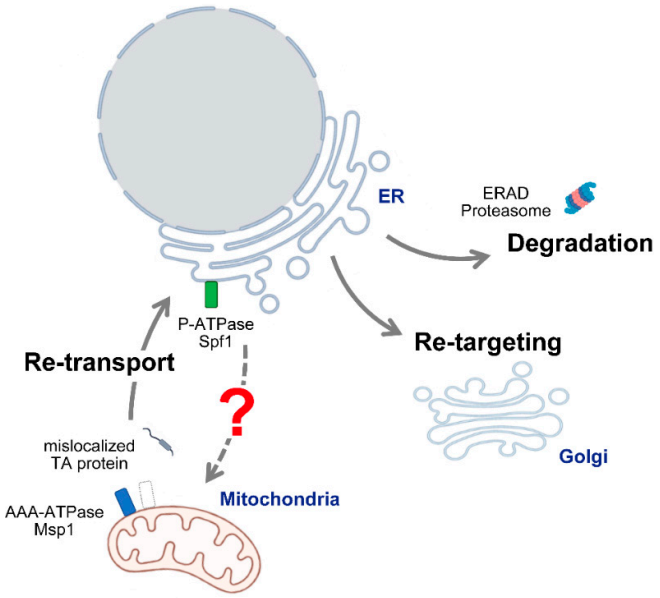
107　オルガネラ間における膜タンパク質再配送機構の解明	小野　鈴花

【目的】細胞内における膜タンパク質のオルガネラ局在は各々に特異的な因子や経路によって厳密に制御され、正しい局在化（targeting）に失敗した膜タンパク質は速やかに分解されると考えられてきた。しかし近年、膜タンパク質が本来とは異なるオルガネラへと誤局在する現象が数多く報告され、膜タンパク質の局在制御に関わる「新たなシステム」の存在が示唆されている。実際に、これまでの解析からミトコンドリア外膜に存在する AAA-ATPase の Msp1 はミトコンドリアに誤局在した TA (Tail-Anchored) タンパク質を外膜から引き抜き、ER へと再配送することが明らかとなった。一方、ER 膜に存在する P-ATPase の Spf1 も TA タンパク質の引き抜き活性を有し、Spf1 の欠損は本来ミトコンドリアに局在するべき TA タンパク質の ER 誤局在を引き起こすことが知られており、ER においても ATPase を介した「膜タンパク質の再配送機構」が存在することが推測される。本研究は、著者らのグループが見出した ATPase による「膜タンパク質の再配送機構」をもとに、ER に存在する P-ATPase の Spf1 に着目し、ER-ミトコンドリア間における ATPase を介した膜タンパク質の引き抜きによる再配送が膜タンパク質の正しい細胞内分布を実現する「新たな局在制御システム」について探究する。

【方法】出芽酵母を用いて Spf1 の欠損株および内在性のミトコンドリア外膜タンパク質を蛍光タンパク質の付加によって可視化した株を作製し、蛍光顕微鏡による観察を行うことで、Spf1 の欠損によって ER 誤局在が生じるミトコンドリア外膜タンパク質の探索を行った。また、これまでに著者らのグループが確立した目的タンパク質の選択的誘導発現系を用い、Spf1 による膜からの引き抜きを介した膜タンパク質の再配送について、Spf1 の発現依存的な ER 誤局在タンパク質の局在移行の検証を行った。

【結果】Spf1 の欠損はミトコンドリア外膜に存在する TA タンパク質だけでなく、N アンカー型膜タンパク質の ER 誤局在も引き起こし、Spf1 の再発現は ER に誤局在したミトコンドリア外膜タンパク質をミトコンドリアへと再配送することが確認された。これらの知見から、一部のミトコンドリア外膜タンパク質は ER への局在化（誤局在）を可能とし、ER に誤局在したミトコンドリア外膜タンパク質は Spf1 による引き抜きを介してミトコンドリアへと再配送されることで正しい細胞内分布を実現する新たな局在制御システムが存在することが示唆された。

ER-ミトコンドリア間における ATPase を介した膜タンパク質の再配送機構



107. オルガネラ間における膜タンパク質再配送機構の解明

小野　鈴花

*京都産業大学 タンパク質動態研究所

Key words：タンパク質輸送，膜タンパク質，ミトコンドリア，小胞体，ATPase

緒　言

核内で転写された膜タンパク質は、翻訳と共に（co-translational）もしくは翻訳された後に（post-translational）目的のオルガネラへと局在化（targeting）する。C 末領域に疎水性の膜貫通領域を一つ持つ TA（Tail-Anchored）タンパク質は、サイトゾルで翻訳された後に進化的に保存された経路によって小胞体（ER：Endoplasmic Reticulum）、ミトコンドリア、ペルオキシソームへと配送される。TA タンパク質の ER への配送は、Get3（酵母）／TRC40（ヒト）が調節する GET（Guided Entry of Tail-anchored）経路が担い、GET 経路が欠損すると本来 ER に配送されるべき TA タンパク質がミトコンドリアに誤局在することが報告されている［1］。しかし、TA タンパク質のミトコンドリアへの配送に関わる因子や経路などの局在化メカニズムについては未だ不明点が多く残されている。

ミトコンドリア外膜に存在する AAA-ATPase の Msp1（酵母）／ATAD1（ヒト）は、ミトコンドリアに誤局在した TA タンパク質を外膜から引き抜き、分解系に回すことが知られている［2，3］。出芽酵母の Msp1 については、著者らのグループが確立したタンパク質の選択的誘導発現系を用いた解析から、Msp1 によってミトコンドリア外膜から引き抜かれた TA タンパク質が GET 経路を介して ER に再配送されること、そして ER においてユビキチン - プロテアソーム分解系の ERAD（ER-Associated Degradation）によって分解、もしくは TA タンパク質が本来局在する分泌経路下流のオルガネラに再び局在化することが明らかとなった［4，5］。一方、ER 膜に存在する P-ATPase の Spf1（酵母）／ATP13A1（ヒト）も TA タンパク質の引き抜き活性を有し、Spf1／ATP13A1 の欠損は本来ミトコンドリアに配送されるべき TA タンパク質の ER 誤局在を引き起こすことが報告されている［3，6〜8］。したがって、ER においてもミトコンドリアと同様に、ATPase を介した膜タンパク質の引き抜きによる「膜タンパク質の再配送機構」が存在することが示唆される［9］。

本研究では、著者らのグループが見出した ATPase による「膜タンパク質の再配送機構」［4，5］をもとに、ER に存在する P-ATPase の Spf1 に着目し、ATPase を介した膜タンパク質の引き抜きによる再配送が膜タンパク質の正しい細胞内分布を実現する新たな局在制御システムの存在を明らかとするため、Spf1 の分子機能解析を行った。その結果、Spf1 の欠損はミトコンドリア外膜に存在する TA タンパク質だけでなく、N アンカー型膜タンパク質の ER 誤局在も引き起こし、Spf1 の再発現は ER に誤局在したミトコンドリア外膜タンパク質をミトコンドリアへと再配送することが確認された。これらの知見から、一部のミトコンドリア外膜タンパク質は ER への局在化（誤局在）を可能とし、ER に誤局在したミトコンドリア外膜タンパク質は Spf1 による引き抜きを介してミトコンドリアへと再配送されることで正しい細胞内分布を実現する新たな局在制御システムが存在することが示唆された。

方法および結果

1. Spf1 の欠損はミトコンドリア外膜タンパク質の ER 誤局在を引き起こす

出芽酵母を用いて Spf1 の欠損によるミトコンドリア外膜（MOM：Mitochondrial Outer Membrane）タンパ

*現在の所属：京都産業大学 生命科学部

ク質および内膜（MIM：Mitochondrial Inner Membrane）タンパク質のミトコンドリア局在への影響を検証するため、内在性 MOM タンパク質（Fis1、Tom20、Tom70、Msp1）および MIM タンパク質（Oxa1）の N 末または C 末に蛍光タンパク質 mNG（mNeonGreen）を付加した野生（WT：Wild Type）株と Spf1 欠損（*spf1*Δ）株を作製し、蛍光顕微鏡を用いて細胞内局在解析を行った。その結果、MIM タンパク質の Oxa1 は *spf1*Δ株でもミトコンドリアに局在する（図 1b）一方で、WT 株ではミトコンドリア外膜に局在する TA タンパク質の Fis1 が *spf1*Δ株では ER に誤局在することが確認された（図 1a）。また、N アンカー型膜タンパク質の Tom20、Tom70 が *spf1*Δ株でもミトコンドリアに局在するのに対し（図 1a）、Msp1 は ER に誤局在することが観察された（図 1a）。したがって、Spf1 の欠損はミトコンドリア外膜に存在する TA タンパク質だけでなく、一部の N アンカー型膜タンパク質の ER 誤局在も引き起こすことが明らかとなった。

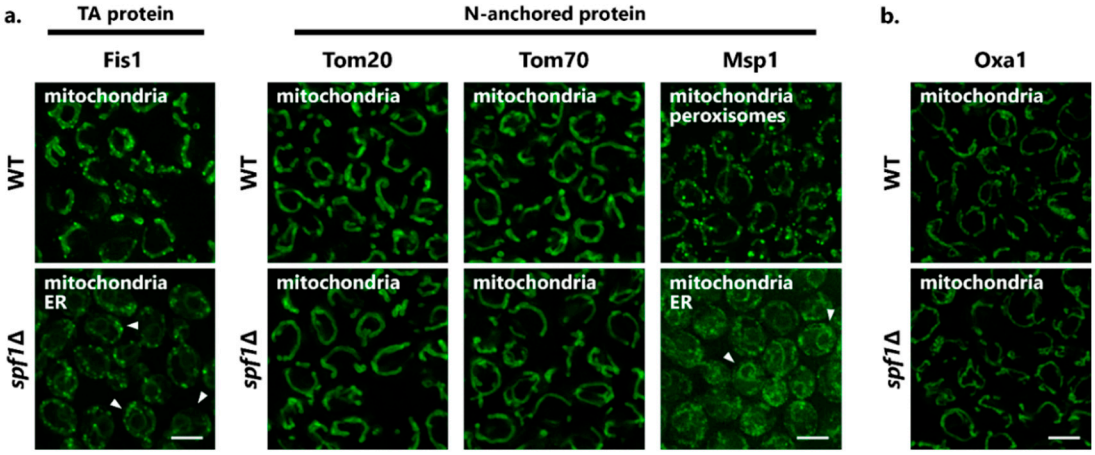


図 1. Spf1 の欠損条件における MOM および MIM タンパク質の細胞内局在

a) 野生株（WT）および Spf1 欠損株（*spf1*Δ）における内在性 MOM タンパク質の細胞内局在解析を行った。緑色は MOM タンパク質（mNG-Fis1、Tom20-mNG、Tom70-mNG、Msp1-mNG）、矢印は ER に誤局在したシグナルを示す（スケールバー：5 μm）。

b) 野生株（WT）および Spf1 欠損株（*spf1*Δ）における内在性 MIM タンパク質の細胞内局在解析を行った。緑色は MIM タンパク質（Oxa1-mNG）を示す（スケールバー：5 μm）。

2. ミトコンドリア外膜タンパク質の ER 誤局在は Spf1 の欠損依存的に引き起こされる

Spf1 の欠損は ER ストレス［7］や細胞内の脂質恒常性異常［8］を引き起こすことが報告されている。そこで、Spf1 の欠損が引き起こす MOM タンパク質の ER 誤局在と他の障害との関係について検証を行うため、mNG の付加によって内在性タンパク質を可視化した WT 株および遺伝子欠損株を作製し、ER ストレスおよびミトコンドリア障害条件、また脂質恒常性異常条件における内在性 Fis1（TA タンパク質）および Msp1（N アンカー型膜タンパク質）の細胞内局在解析を行った。その結果、Fis1 および Msp1 の ER 誤局在は ER ストレス（図 2a）、またミトコンドリア障害（図 2b）条件においても確認されなかった。さらに、エルゴステロール合成経路に関与する転写因子の Upc2 と Ecm22（Upc2 のパラログ）を欠損した脂質恒常性異常モデル株（*ecm22*Δ *upc2*Δ）［10］においても Fis1 と Msp1 の ER 誤局在は確認されなかった（図 2c）。したがって、MOM タンパク質の ER 誤局在は細胞内における ER ストレスやミトコンドリア障害、また脂質恒常性の異常に関わらず、Spf1 の欠損依存的に引き起こされることが確認された。

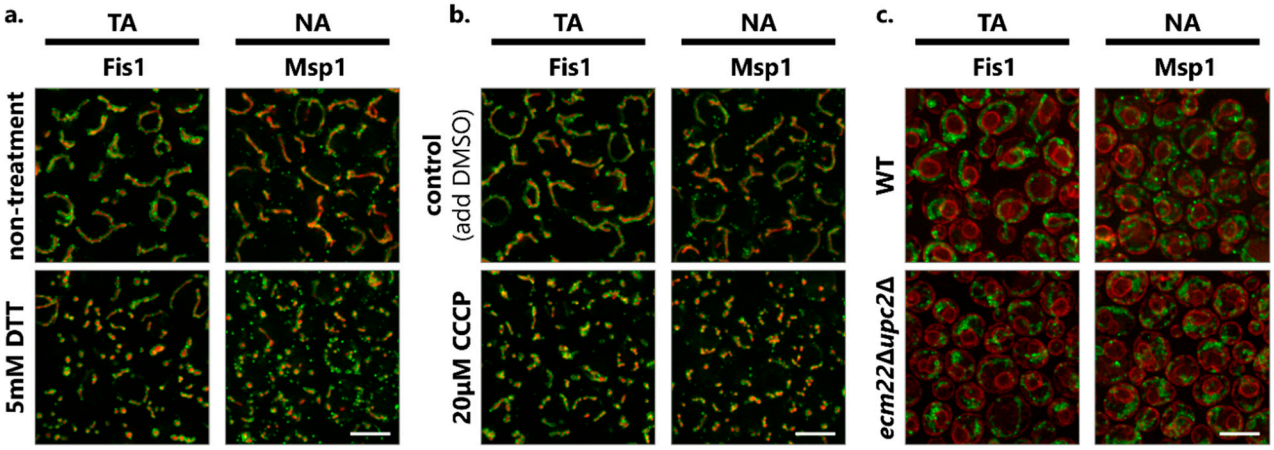


図 2. 各 *spf1*Δ模倣条件における MOM タンパク質の細胞内局在

a) DTT の添加（final 5 mM, 30℃ 2 h）による ER ストレス条件下の内在性 Fis1（TA : TA タンパク質）および Msp1（NA : N アンカー型膜タンパク質）の細胞内局在を蛍光顕微鏡によって観察した。緑色は MOM タンパク質（mNG-Fis1、Msp1-mNG）、赤色はミトコンドリア（Su9-RFP）を示す（スケールバー：5 μm）。

b) CCCP の添加（final 20 μM、30℃、30 min）によるミトコンドリア障害条件下の内在性 Fis1（TA : TA タンパク質）および Msp1（NA : N アンカー型膜タンパク質）の細胞内局在を蛍光顕微鏡によって観察した。緑色は MOM タンパク質（mNG-Fis1、Msp1-mNG）、赤色はミトコンドリア（Su9-RFP）を示す（スケールバー：5 μm）。

c) Upc2 および Ecm22 の欠損による脂質恒常性異常条件下の内在性 Fis1（TA : TA タンパク質）および Msp1（NA : N アンカー型膜タンパク質）の細胞内局在を蛍光顕微鏡によって観察した。緑色は MOM タンパク質（mNG-Fis1、Msp1-mNG）、赤色は ER（BipN-mCherry-HDEL）を示す（スケールバー：5 μm）。

3. Spf1 は ER に誤局在したミトコンドリア外膜タンパク質をミトコンドリアへ再配送する

Spf1 による膜タンパク質の引き抜きを介した再配送について検証を行うため、著者らの確立した目的タンパク質の選択的誘導発現系［4，5］を用い、*spf1*Δ株にガラクトース誘導性プロモーターによって発現する *GAL1*p_3xFLAG-mNG-Fis1C$^{132\text{-}155}$（TA タンパク質）また Msp1N$^{1\text{-}35}$-3xFLAG-mNG（N アンカー型膜タンパク質）およびシアナミド誘導性プロモーターによって発現する *DDI2*p_Spf1-HA をインテグレーションし、蛍光顕微鏡によって ER 誤局在タンパク質の Spf1-rescue（再発現）条件における観察を行った。目的のタンパク質をガラクトースによって発現した後にグルコース培地を用いた洗浄とインキュベーションによって発現を停止し、シアナミドによる Spf1 の発現後 1 時間ごとに観察を行った。その結果、ER に誤局在した Fis1（図 3a）と Msp1（図 3b）は、Spf1 の発現と共にミトコンドリアへと局在移行する様子が観察された。さらに、Su9-RFP によって可視化されたミトコンドリアと Fis1（図 3a、右グラフ）および Msp1（図 3b、右グラフ）の共存率を定量解析した結果、共存率（Pearson's R）が経時的に増加することが確認された。

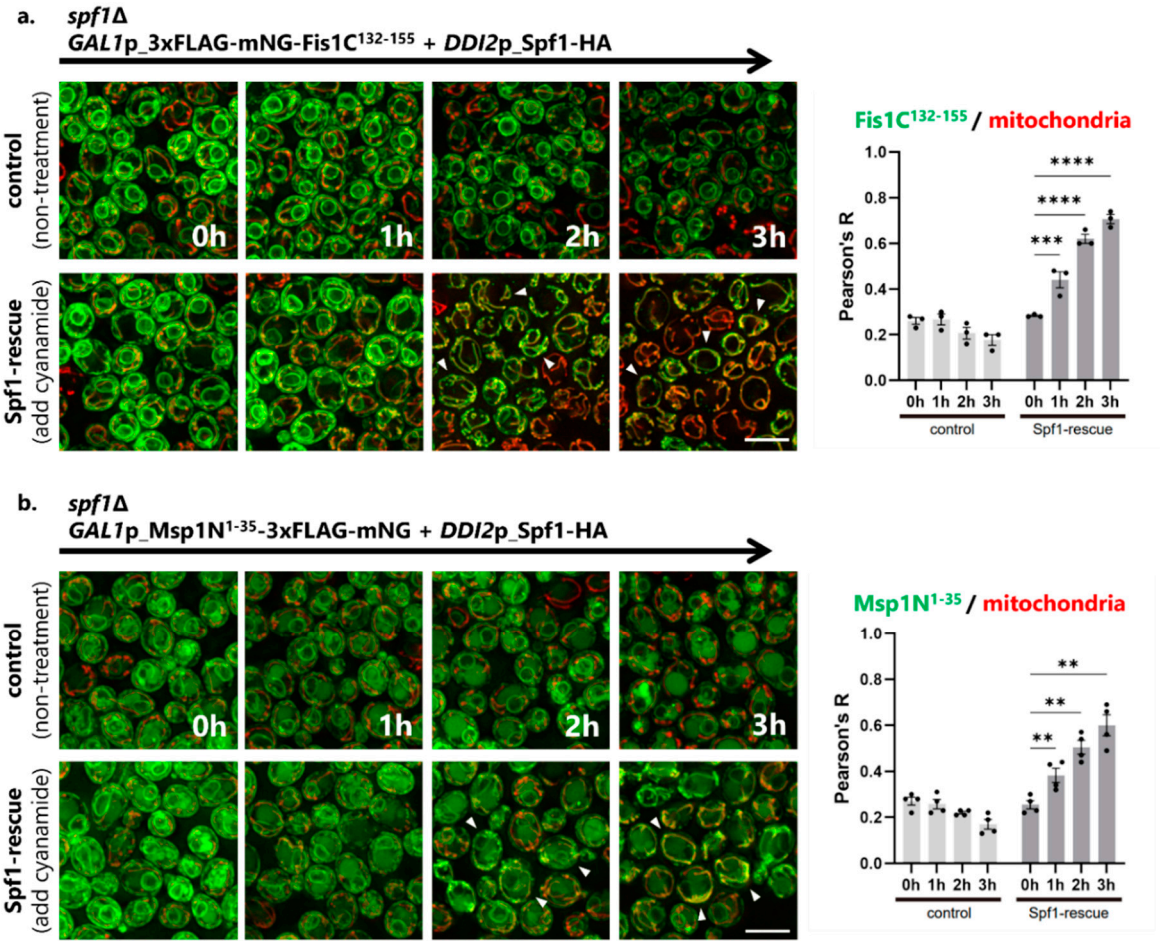


図 3. Spf1 の再発現（Spf1-rescue）による ER 誤局在タンパク質の再配送

a) Spf1 の欠損株（*spf1*Δ）にガラクトース誘導性プロモーターを用いて発現させた 3xFLAG-mNG-Fis1C$^{132\text{-}155}$（TA タンパク質）を、シアナミド誘導性プロモーターによる Spf1 の発現後 1 時間ごとに観察（0 h、1 h、2 h、3 h）した。緑色は TA タンパク質（3xFLAG-mNG-Fis1C$^{132\text{-}155}$）、赤色はミトコンドリア（Su9-RFP）を示す。右のグラフは、3xFLAG-mNG-Fis1C$^{132\text{-}155}$（緑色）とミトコンドリア（赤色）の共存率を Pearson's correlation coefficient（R）を用いて定量解析した結果を示す。統計処理には 2way ANOVA（***p＜0.001、****p＜0.0001）を用いた（スケールバー：5 μm）。

b) Spf1 の欠損株（*spf1*Δ）にガラクトース誘導性プロモーターを用いて発現させた Msp1N$^{1\text{-}35}$-3xFLAG-mNG（N アンカー型膜タンパク質）を、シアナミド誘導性プロモーターによる Spf1 の発現後 1 時間ごとに観察（0 h、1 h、2 h、3 h）した。緑色は N アンカー型膜タンパク質（Msp1N$^{1\text{-}35}$-3xFLAG-mNG）、赤色はミトコンドリア（Su9-RFP）を示す。右のグラフは、Msp1N$^{1\text{-}35}$-3xFLAG-mNG（緑色）とミトコンドリア（赤色）の共存率を Pearson's correlation coefficient（R）を用いて定量解析した結果を示す。統計処理には 2way ANOVA（**p＜0.01）を用いた（スケールバー：5 μm）。

考　察

今回の解析から、Spf1 の欠損によってミトコンドリア外膜に存在する TA タンパク質だけでなく、一部の N アンカー型膜タンパク質も ER に誤局在することが新たに明らかとなった。また、Spf1 の欠損によって引き起こされる MOM タンパク質の ER 誤局在は、ER ストレスやミトコンドリア障害、そして細胞内の脂質恒常性異常にも依存しないことから、ER における誤局在タンパク質の引き抜き不全によって誤局在タンパク質の蓄積が生じていることが考えられる。さらに、Spf1 の再発現は ER に誤局在した MOM タンパク質をミトコンドリアへと再配送することが確認された。したがって、一部の MOM タンパク質は ER への局在化（誤局在）を可能とし、誤局在した MOM タンパク質は Spf1 による引き抜きを介してミトコンドリアへと再配送されることで正しい細胞内分布を実現する「新たな局在制御システム」が存在することが示唆される。また、これらの知見から未だ不明点の多い TA タンパク質のミトコンドリア局在化経路についても、新規合成タンパク質が ER を経由してミトコンドリアへと局在化する再配送を介した間接的な経路が存在する可能性が考えられる。今後は Spf1 の欠損が引き起こす膜タンパク質の ER 誤局在について、その分子メカニズムおよび Spf1 の基質タンパク質を網羅的に探索することで、Spf1 が ER で制御する「膜タンパク質の再配送機構」の全容解明を目指したい。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都産業大学タンパク質動態研究所および生命科学部遠藤研究室で実施いたしました。京都産業大学生命科学部の遠藤斗志也教授、また九州大学大学院農学研究院の松本俊介助教に感謝申し上げます。

文　献

1） Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, Schwappach B, Weissman JS. The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. Cell. 2008 Aug 22;134(4):634-45. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.025. PMID: 18724936; PMCID: PMC2572727.

2） Okreglak V, Walter P. The conserved AAA-ATPase Msp1 confers organelle specificity to tail-anchored proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Jun 3;111(22):8019-24. doi: 10.1073/pnas.1405755111. Epub 2014 May 12. PMID: 24821790; PMCID: PMC4050615.

3） Dederer V, Khmelinskii A, Huhn AG, Okreglak V, Knop M, Lemberg MK. Cooperation of mitochondrial and ER factors in quality control of tail-anchored proteins. Elife. 2019 Jun 7;8:e45506. doi: 10.7554/eLife.45506. PMID: 31172943; PMCID: PMC6586462.

4） Matsumoto S, Nakatsukasa K, Kakuta C, Tamura Y, Esaki M, Endo T. Msp1 Clears Mistargeted Proteins by Facilitating Their Transfer from Mitochondria to the ER. Mol Cell. 2019 Oct 3;76(1):191-205.e10. doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.006. Epub 2019 Aug 21. PMID: 31445887.

5） Matsumoto S, Ono S, Shinoda S, Kakuta C, Okada S, Ito T, Numata T, Endo T. GET pathway mediates transfer of mislocalized tail-anchored proteins from mitochondria to the ER. J Cell Biol. 2022 Jun 6;221(6):e202104076. doi: 10.1083/jcb.202104076. Epub 2022 Apr 20. PMID: 35442388; PMCID: PMC9026240.

6） McKenna MJ, Sim SI, Ordureau A, Wei L, Harper JW, Shao S, Park E. The endoplasmic reticulum P5A-ATPase is a transmembrane helix dislocase. Science. 2020 Sep 25;369(6511):eabc5809. doi: 10.1126/science.abc5809. PMID: 32973005; PMCID: PMC8053355.

7) Cohen Y, Megyeri M, Chen OC, Condomitti G, Riezman I, Loizides-Mangold U, Abdul-Sada A, Rimon N, Riezman H, Platt FM, Futerman AH, Schuldiner M. The yeast p5 type ATPase, spf1, regulates manganese transport into the endoplasmic reticulum. PLoS One. 2013 Dec 31;8(12):e85519. doi: 10.1371/journal.pone.0085519. PMID: 24392018; PMCID: PMC3877380.
8) Krumpe K, Frumkin I, Herzig Y, Rimon N, Özbalci C, Brügger B, Rapaport D, Schuldiner M. Ergosterol content specifies targeting of tail-anchored proteins to mitochondrial outer membranes. Mol Biol Cell. 2012 Oct;23(20):3927-35. doi: 10.1091/mbc.E11-12-0994. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22918956; PMCID: PMC3469509.
9) Dederer V, Lemberg MK. Transmembrane dislocases: a second chance for protein targeting. Trends Cell Biol. 2021 Nov;31(11):898-911. doi: 10.1016/j.tcb.2021.05.007. Epub 2021 Jun 16. PMID: 34147299.
10) Yang H, Tong J, Lee CW, Ha S, Eom SH, Im YJ. Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. Nat Commun. 2015 Feb 6;6:6129. doi: 10.1038/ncomms7129. PMID: 25655993.