

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 号	氏 名	酒井 久美子
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	堀 久 典 (印)
		副査氏名	吉 岡 秀 克 (印)
		副査氏名	瀧 田 文 彦 (印)
<p>論文題目 A Novel Fractionation Method of the rough ER Integral Membrane Proteins; Resident Proteins vs. Exported proteins?</p> <p>論文掲載誌名: Proteomics, 9(11), 1-12, 2009.</p> <p>論文要旨</p> <p>【緒言】粗面小胞体はタンパク質および脂質の生合成の場であり、細胞質側で翻訳合成が開始されたタンパク質は膜透過機構により内腔へ放出、または、膜へ組み込まれる。新たに合成されたタンパク質と脂質は小胞輸送によって連携している分泌経路に入る。経路に沿った様々な細胞器官はそのタンパク質の構成と膜脂質の組成の両方において大きな差を見せるが、膜内在性タンパク質が膜脂質と如何に相互作用しているかを検討し、小胞体膜脂質の役割を探った。【材料及び方法】高塩濃度処理した大豚臓粗面小胞体(KRM)を用いた。低濃度界面活性剤(0.18%Triton X-100)を用いてタンパク質を抽出し、抽出画分と残った膜画分(0.18%Tx KRM)とに分画した。さらに抽出画分から膜の再構成を行い、抽出された膜タンパク質が回収されると期待されるプロテオリポソーム画分と、ERの内腔タンパク質画分に分けた。更に、0.18%Tx KRM 膜と、プロテオリポソーム膜とをアルカリ処理し、両者の内在性膜タンパク質を二次元ゲル電気泳動解析と LC/MS/MS によるタンパク質の同定を行った。【結果】KRM の膜分画後のそれぞれの電子顕微鏡観察は、残存した膜画分(0.18%Tx KRM)は KRM と膜構造に大差はないが、プロテオリポソーム画分は可溶化-再構成の結果、小胞のサイズが明らかに大きくなった。免疫プロット法では、KRM の Sec61<math>\alpha</math> と calnexin の大部分が抽出されず、0.18%Tx KRM に留まった。これらの内在性膜タンパク質とは対照的に、KRM 内腔タンパク質である ERp72 は、内腔タンパク質画分に抽出、回収された。0.18%Tx 処理で KRM は内腔タンパク質を放出したが、大部分の膜タンパク質は 0.18%Tx KRM に留まっていること、プロテオリポソーム画分には膜脂質の一部と共に溶け出した少量の膜タンパク質が存在することが明らかになった。二次元ゲル電気泳動の結果、KRM 画分と 0.18%Tx KRM 画分でタンパク質のプロファイルに大差はなかった。プロテオリポソーム画分に特異的に回収されたタンパク質を LC/MS/MS で同定すると、ほとんど ER から搬出されるタンパク質で占められ、0.18%Tx KRM 全画分の LC/MS/MS の結果は KRM 局在タンパク質で占められた。次に内在性膜タンパク質の TCR<math>\alpha</math> を in vitro 翻訳-転移システムで検証すると、プロテオリポソームに回収され、HSP47 は内腔タンパク質画分に回収された。【考察】0.18%Triton X-100 抽出に続くプロテオリポソーム再構成処理の組み合わせの手法により、KRM タンパク質が 0.18%Tx KRM, プロテオリポソーム, 内腔タンパク質の 3 分画に分けられ、それぞれの画分には機能的に選別されるタンパク質が分画された。この結果は ER 膜脂質が従来考えられてきた様な均一でランダムな分布をしているのではない可能性を示唆すると同時に、タンパク質の ER におけるソーティングにも新たな役割を果たしている可能性を示唆する。</p> <p>本研究は、粗面小胞体膜成分を新奇な方法で分画・回収して本来の構造、機能を維持することを証明した意義ある研究であり、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 酒井 久美子

## A Novel Fractionation Method of the rough ER Integral Membrane Proteins; Resident Proteins vs. Exported proteins?

(粗面小胞体内在性膜タンパク質の新奇な分画法；  
固有タンパク質 対 搬出タンパク質)

【緒言】粗面小胞体(rER)はタンパク質および脂質の生合成の場であり、特徴的な構成を持つ。細胞質側で翻訳合成が開始されたタンパク質は膜透過機構により内腔へ放出、または、膜へ組み込まれる。新たに合成されたタンパク質と脂質は小胞輸送によって連携している分泌経路に入る。経路に沿った様々な細胞器官はそのタンパク質の構成と膜脂質の組成の両方において大きな差を見せる。ER という同じ場で合成され同じ分泌経路 により輸送されるにもかかわらず、これらタンパク質と脂質のコラボレーションについては不明の点が多い。私たちは膜内在性タンパク質が膜脂質と如何に相互作用しているかを検討し、小胞体膜脂質の役割を探る。

【材料及び方法】高塩濃度処理した犬豚臓粗面小胞体(KRM)を材料として用いた。KRM を可溶化するため、低濃度界面活性剤(0.18%Triton X-100)を用いてタンパク質を抽出し、抽出画分と残った膜画分(0.18%Tx KRM)とに分けた。さらに抽出画分から膜の再構成を行い、抽出された膜タンパク質が回収されると期待されるプロテオリポソーム画分と、プロテオリポソームに回収されない ER の内腔タンパク質画分に分けた。次に0.18%Tx KRM膜と、プロテオリポソーム膜とをアルカリで処理し、両者の内在性膜タンパク質を対象を絞って、二次元ゲル電気泳動解析とLC/MS/MSによるタンパク質の同定を行った。

【結果】 KRM の膜分画後のそれぞれの電子顕微鏡観察は、残存した膜画分(0.18% Tx KRM)は KRM と膜構造に大きな違いはない(タンパク質膜透過活性および糖鎖付加活性も維持していることを既に報告、文献 16)が、プロテオリポソーム画分は可溶化・再構成の結果、小胞のサイズが明らかに大きくなった。免疫プロット法では、KRM の Sec61 $\alpha$ と calnexin の大部分が抽出されず、0.18%Tx KRM に留まることがわかった。これらの内在性膜タンパク質とは対照的に、KRM 内腔タンパク質である ERp72 は、内腔タンパク質画分に抽出、回収された。0.18%Tx 処理で KRM は内腔タンパク質を放出したが大部分の膜タンパク質は 0.18%Tx KRM に留まっていること、プロテオリポソーム画分には膜脂質の

一部分と共に溶け出した少量の膜タンパク質が存在することが明らかになった。二次元ゲル電気泳動の結果、KRM 画分と 0.18%Tx KRM 画分でタンパク質のプロファイルに大きな違いはなかった。プロテオリポソーム画分に特異的に回収されたタンパク質を同定する目的でプロテオリポソーム画分において 0.18%Tx KRM のスポットと一致し、かつ 2 倍量以上あるスポットを切り出し、LC/MS/MS によるタンパク質の同定を行った。これらはほとんど ER から搬出されるタンパク質で占められ、0.18%Tx KRM 全画分の LC/MS/MS の結果は KRM 局在タンパク質で占められた。次に内在性膜タンパク質で ER 膜から搬出される TCR  $\alpha$  を *in vitro* 翻訳・転移システムで膜に組み込み、検証を試みたところ、予想通りプロテオリポソームに回収され、HSP47 は内腔タンパク質画分に回収された。

【考察】0.18%Triton X-100 抽出に続くプロテオリポソーム再構成処理の組み合わせの手法により、KRM タンパク質が 0.18%Tx KRM, プロテオリポソーム, 内腔タンパク質の 3 分画に分けられ、それぞれの画分には機能的に選別されるタンパク質が分画された。この結果は ER 膜脂質が従来考えられてきた様な均一でランダムな分布をしているのではない可能性を示唆すると同時に、タンパク質の ER におけるソーティングにも新たな役割を果たしている可能性を示唆する。