

## I 膜タンパク質の細胞内局在化とトポロジー形成機構

### Molecular Mechanism for Topogenesis and Targeting of Membrane Proteins in the Cell

阪口雅郎・木田祐一郎・衣斐義一  
Sakaguchi, M., Kida, Y., Emi, Y.

細胞および細胞内小器官（オルガネラ）は、脂質とタンパク質からなる生体膜によって仕切られており、それぞれ固有の成分を集積して各自の機能を果たしている。生体膜に埋まり込んでいるタンパク質は内在性膜タンパク質と呼ばれ、膜内外の物質輸送、情報交換、膜構造の構築・維持といった生命に必須の機能を担っている。膜タンパク質も他のタンパク質と同様に細胞質のリボソームで合成されるが、適切なオルガネラへと局在化し、各膜貫通配列が正しい膜内外の方向性（膜トポロジー）で膜に組み込まれ、更に機能的構造を形成して初めて働くことができる。本研究では、小胞体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、といったオルガネラに存在する膜タンパク質の各オルガネラへの局在化機構、並びに膜内への組み込み機構の理解を目指している。研究状況は、以下の通りである。

①分泌系オルガネラ（小胞体、ゴルジ体、リソソーム、細胞膜など）の膜タンパク質は、小胞体で膜に組み込まれた後、各目的地へと輸送される。粗面小胞体において、リボソームはタンパク質膜透過チャネル（トランスロコン）に直接結合しており、リボソームで合成されて出てきた膜貫通配列は、順次トランスロコンから脂質環境へと横方向に放出されることで膜に埋まり込んでいく。この膜貫通配列の移行過程について、配列内に導入したシステイン残基への親水環境依存的な化学修飾を利用して追跡したところ、配列自身の貫通状態の形成と脂質環境への進入とがほぼ同時に起こることが分かった。また、同じ化学修飾法による膜透過中間状態のポリペプチド鎖の環境探査から、トランスロコンがポリペプチド鎖 2 本分の親水性孔を一度に形成しうることを示された。以上の結果は、膜組み込み時におけるトランスロコン、及びその中を通るポリペプチド鎖の動態の一端を示している。

②上記リボソーム-トランスロコン複合体において、ポリペプチド鎖伸長反応に伴った膜透過途中に疎水性配列が現れた場合、トランスロコンにおいて透過停止、脂質環境へと送出される膜組み込み様式が存在する。正荷電アミノ酸残基が疎水性配列の下流に存在することで、膜組み込みが促進されることが分かっているが、この正荷電残基の作用についてより詳細に調べたところ、疎水性配列の 60 残基後方からでも機能すること、また正電荷領域がリボソームから露出する前に疎水性配列が一旦内腔へと透過し、正電荷の出現とともに膜内へと再配置されることが示唆された。更に、正荷電残基のみでもその個数に応じて膜透過を停止させることも分かった。トランスロコンにおける各配列の認識メカ

ニズムの解明につながる結果である。

③ペルオキシソーム膜の ABC 輸送体 PMP70 (6 回膜貫通タンパク質) は、細胞質遊離リボソームで合成された後に局在化する。アミノ末端約 80 残基の親水性配列及びそれに続く 1 番目及び 2 番目の膜貫通配列までの部分だけでもペルオキシソームへと正確に局在化するが、アミノ末端親水性配列のみではミトコンドリア、2 本の膜貫通配列のみでは小胞体に局在化することが分かった。これらの配列が時系列的、複合的に作用することで、ペルオキシソームへの局在化が行われることが示唆される。

## II 低分子有機化合物に対する生体防御系の機能制御

### Regulation of Antiorganochemical Detoxification System

衣斐義一・阪口雅郎

Emi, Y., Sakaguchi, M.

人間を含めて動物の体には、体内で合成された過剰な生理活性物質や食物などから摂取した多種多様な有機化合物を適切に処理して無害化する仕組みがある。化学物質に対する生体防御は、初めに酸素添加などにより官能基を導入し、続いてグルクロン酸などの水溶性原子団を抱合し、最後に抱合体を細胞外へ排出するという三つのステップに分けられる。当研究室では、抱合反応に関わるグルクロン酸転移酵素 (UGT) と排出ポンプである ABC (ATP-binding cassette) 輸送体にスポットを当て、それぞれのタンパク質の生合成や機能を制御するしくみや遺伝子発現を制御する機構を解き明かし、最終的には生体防御系の制御機構の全体像に迫ることを目標にして研究を進めている。

グルクロン酸抱合体などを肝臓から胆管へ排出する輸送体である ABCC2 は、肝細胞において血管側ではなく胆管側の細胞膜に極性をもって局在化することが知られる。ABCC2 の極性局在化機構を解析する実験系を肝癌に由来する HepG2 細胞を使って構築し、この実験系を用いて極性局在化の制御機構について解析を進めている。また、ABCC2 の胆管側細胞膜への局在に関わるタンパク質を同定することを試みている。全長 ABCC2 タンパク質に対して ABCC2 の細胞質側ドメインを過剰発現させた細胞において、ABCC2 の局在がドミナントネガティブ的に攪乱されることを見出しており、この現象を詳しく解析することによって複数の局在化シグナルの候補配列を見出すことが出来た。また、プルダウンアッセイと酵母ツーハイブリッド法の二つの方手法を使って ABCC2 のもつ局在化シグナルと結合する制御タンパク質を同定することを進めており、現時点では ABCC2 のカルボキシ末端に結合するアダプタータンパク質を見出すに至っている。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 Y.Kida, C.Kume, M.Hirano, M.Sakaguchi : Environmental transition of signal-anchor sequences during membrane insertion via the endoplasmic reticulum translocon, *Mol. Biol. Cell*, 21, 418-429. (2010)
- I-2 Y.Kida, F.Morimoto, M.Sakaguchi : Signal-anchor sequence provides motive force for polypeptide-chain translocation through the ER membrane, *J. Biol. Chem.* 284, 2861-2866 (2009)
- I-3 Y.Kashiwayama, M.Seki, A.Yasui, Y.Murasaki, M.Morita, Y.Yamashita, M.Sakaguchi, Y.Tanaka, T.Imanaka, : 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins, *Exp. Cell Res.*, 315, 190-205 (2009)
- I-4 阪口雅郎 : 小胞体トランスロコンでの膜透過停止とポリペプチド鎖のダイナミクス、第 82 回日本生化学会大会・シンポジウム (神戸) 2009
- I-5 衣斐義一・野村幸子・横田 博・阪口雅郎 : ABCC2 と PDZK1 との相互作用による微小胆管細胞への局在化制御、第 82 回日本生化学会大会・ポスター (神戸) 2009
- I-6 木田祐一郎・久米千智・平野真希・阪口雅郎 : 複雑な膜組み込み中間体が見出す小胞体トランスロコンの柔軟性、第 82 回日本生化学会大会・トーク&ポスター (神戸) 2009
- I-7 岩下昌平・山下ゆかり・木田祐一郎・阪口雅郎 : ペルオキシソーム ABC 輸送体 PMP70 の N-末端に存在する小胞体標的化抑制モチーフ、第 82 回日本生化学会大会・トーク&ポスター (神戸) 2009
- I-8 藤田英伸・山岸麻里英・木田祐一郎・阪口雅郎 : 小胞体トランスロコンの膜透過は正電荷アミノ酸残基のみによって停止する、第 82 回日本生化学会大会・トーク&ポスター (神戸) 2009
- I-9 矢吹隆明・木田祐一郎・阪口雅郎 : 赤血球 Band3 タンパク質で見られる膜貫通配列の強制膜組み込み機構、第 82 回日本生化学会大会・トーク&ポスター (神戸) 2009
- I-10 山岸麻里英・藤田英伸・森本富美子・木田祐一郎・阪口雅郎 : 小胞体でのタンパク質膜透過における部位特異的な糖鎖のラチェット作用、第 82 回日本生化学会大会・トーク&ポスター (神戸) 2009
- I-11 阪口雅郎・木田祐一郎・森本富美子 : 小胞体トランスロコンにおいて膜貫通配列が駆動するポリペプチド鎖膜透過、第 9 回日本蛋白質科学会年会・ポスター (熊本) 2009
- I-12 木田祐一郎・久米千智・平野真希・阪口雅郎 : 複雑な膜組み込み中間体が見出す小胞体トランスロコンの柔軟性、第 9 回日本蛋白質科学会年会・ポスター (熊本) 2009
- I-13 M.Sakaguchi : Environment and polypeptide chain movement in protein translocation channel, "International Symposium on Molecular Soft Interactions in Biological Systems" Organized by The Priority Area "Membrane Interface" (Osaka) 2009

- II-1 衣斐義一・野村幸子・横田 博・阪口雅郎： ABCC2 と PDZK1 との相互作用による微小胆管細胞膜への局在化制御、第 82 回日本生化学会大会（神戸）2009
- II-2 Y.Emi, M.Sakaguchi, : Localization of ATP-binding cassette transporter isoform C2 (ABCC2) to canalicular membrane through interaction with PDZK1 adapter protein, 第 32 回日本分子生物学会年会（横浜）2009

## 大学院生命理学研究科

博士前期課程

坂口友紀

岩下昌平

藤田英伸

年未裕輔

## 科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成 20～22 年度） 基盤研究（B） 課題番号:20370041  
研究課題 膜タンパク質の生合成と機能構造形成  
研究代表者 阪口雅郎
- 2 科学研究費補助金（平成 19～23 年度） 特定領域研究 課題番号:19058013  
研究課題 膜タンパク質のオルガネラ膜標的化と構造形成システム  
研究代表者 阪口雅郎
- 3 財団法人住友財団 2008 年度基礎科学研究助成（平成 20～21 年度）  
研究課題 小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質組み込み機構の解明  
研究代表者 木田祐一郎
- 4 科学研究費補助金（平成 21～22 年度） 若手研究（B） 課題番号:21770123  
研究課題 小胞体トランスロコンの機能解析  
研究代表者 木田祐一郎