

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.

細胞および細胞小器官を取り囲む膜に存在する膜タンパク質は、物質輸送・情報交換、エネルギー産生、膜小器官の動態など、様々な機能を担っている。それらは細胞質のリボソームで合成され、適切なオルガネラへ局在化し、膜に組み込まれ、はじめて機能構造を形成できる。我々は、膜タンパク質の小胞体、ミトコンドリア、ペルオキシソームへの局在化、並びに小胞体タンパク質膜透過チャネルを介した膜タンパク質の膜組み込み機構を研究している。本年度は以下の成果を得た。

①小胞体膜のトランスロコンを透過中のポリペプチド鎖上に、疎水性の配列が現れると、透過が停止し疎水性配列は脂質環境へ移行して膜貫通配列となる。比較的疎水性の低い配列であってもその下流に正荷電アミノ酸残基が存在すると膜透過停止することが明らかにされてきた。またこのとき低疎水性配列が 60 残基以上はなれた位置にあっても膜透過停止に寄与できること、このような場合には低疎水性配列は一過的に小胞体内腔へ露出するものの、正電荷の作用によって膜へ逆行し膜貫通トポロジーを形成することを昨年度すでに報告した。この研究をさらに進展させ、内腔に露出した低疎水性配列付近にコア糖鎖が付加することによって逆行が阻止され、結果的に膜透過することを見出した。付加した糖鎖によって、同じ疎水性配列の最終的な膜トポロジーが異なることを実証し、ポリペプチド鎖に付加する糖鎖が、タンパク質の疎水性配列や正電荷に加えて、第三のトポロジー形成要素であることを提案した。

②小胞体でのタンパク質膜透過において、正電荷が、疎水性配列の有無に関わらず一時停止作用を示すことを実証した。これまで、膜タンパク質のトポロジー規定要因として正荷電アミノ酸が広く認識されてきたが、その作用機構の基盤が、膜透過抑制作用にあることを明らかにしたものである。

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からだには、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して排出する仕組みが備わっている。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 ATP-binding cassette (ABC) 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、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 と同じサブファミリーに分類される ABCC1 は、肝細胞において胆管側ではなく血管側の細胞膜に局在化する。本年度は以下の成果を得た。

①ABCC2 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、ABCC2 の極性局在化シグナルを明らかにした。ABCC2 をドメインごとに分けたものを細胞内で過剰発現させ、ABCC2 の局在がドミナントネガティブ的に攪乱される現象を利用して局在化シグナルの候補配列を絞り込み、最終的に 5 アミノ酸からなるシグナル (S²⁸³QDAL²⁸⁷) を見出した。現在のところ、プルダウンアッセイと質量分析を組み合わせた手法を使って ABCC2 の局在化シグナルと結合する制御タンパク質を同定する作業が進展中である。

②ABCC1 と ABCC2 のアミノ酸配列を比較したところ、ABCC2 の極性局在化シグナルに対応する位置に E²⁹⁵EVEALI³⁰¹ で表される acidic di-leucine motif を見出した。部位特異的変異導入法により各々のアミノ酸を置換して局在に及ぼす影響を調べた結果、L³⁰⁰ と I³⁰¹ が極性局在の決定に関わっていることを明らかにした。

発表論文 List of Publications

- I-1 Fujita, H., Yamagishi, M., Kida, Y. and Sakaguchi, M.: Positive charges on the translocating polypeptide chain arrest movement through the translocon, **J. Cell Sci.**, 124, 4184-4193(2011)
- I-2 Yamagishi, M., Fujita, H., Morimoto, F., Kida, Y. and Sakaguchi, M.: A sugar chain at a specific position in the nascent polypeptide chain induces forward movement during translocation through the translocon, **J. Biochem.**, 149, 591-600(2011)
- I-3 姜 公秀・高原教代・木田祐一郎・阪口雅郎：TA 膜タンパク質の小胞体組み込み回避とミトコンドリア標的化機構、第 34 回日本分子生物学会年会、ポスター（横浜）、2011
- I-4 木田祐一郎・藤田英伸・阪口雅郎：小胞体トランスロコンにおける疎水性配列の認識・膜組み込み機構の解析、第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011
- I-5 山本 等・藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンのタンパク質膜透過に対するコレステロールの多面的影響、第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011
- I-6 藤田英伸・山岸麻里英・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体膜トランスロコンにおけるポリペプチド鎖の動き解析、第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011
- I-7 山岸麻里英・大西由希子・藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンを介した膜貫通セグメント形成に対するリボソームの作用、第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011
- I-8 阪上春花・岩下昌平・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンへの組み込みを抑制するアミノ末端モチーフの解析、第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011
- I-9 矢吹隆明・木田祐一郎・阪口雅郎：複雑な膜透過中間体が示す小胞体トランスロコンのポリペプチド鎖収容特性、第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011
- I-10 Yamamoto, H., Fujita, H., Kida, Y. and Sakaguchi, M.: Polypeptide movement in the protein conducting channel is modulated by cholesterol of the endoplasmic reticulum membrane, 第 49 回日本生物物理学会年会（姫路）、2011

- I-11 Fujita, H., Kida, Y., Yamagishi, M. and Sakaguchi, M.: Effect of positive charges on the movement of polypeptide chain through the ER translocon, 第49回日本生物物理学会年会 (姫路)、2011
- I-12 Sakaguchi, M., Iwashita, S., Yamashita, Y., Sakaue, H. and Kida, Y.: ER-targeting Suppression by Short N-terminal Motif of Peroxisomal ABC Transporter, PMP70, 第63回日本細胞生物学会大会 (札幌)、2011
- I-13 藤田英伸・木田祐一郎・山岸麻里芙・阪口雅郎：小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質構造形成への正電荷アミノ酸の寄与、第11回日本蛋白質科学会年会、ポスター (大阪)、2011
- I-14 木田祐一郎・藤田英伸・阪口雅郎：小胞体トランスロコンを介した膜貫通配列組み込み機構の解析、第11回日本蛋白質科学会年会、ポスター (大阪)、2011
- I-15 山本 等・藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎：タンパク質透過チャンネルでのポリペプチドの動きは小胞体膜脂質に影響される、第11回日本蛋白質科学会年会、ポスター (大阪)、2011
- I-16 Kida, Y., Fujita, H. and Sakaguchi, M.: Marginal hydrophobic sequence with downstream positive charges is arrested at but not integrated into the ER membrane. Poster, EMBO conference series "Protein transport systems: structures, mechanisms, and medical aspects" (Italy), 2011
- I-17 Fujita, H., Kida, Y., Yamagishi, M. and Sakaguchi, M.: Positive charges in translocating polypeptide chain regulate the movement through translocon. Poster, EMBO conference series "Protein transport systems: structures, mechanisms, and medical aspects" (Italy), 2011
- II-1 Emi, Y., Nomura, S., Yokota H., Sakaguchi, M. : ATP-binding cassette transporter isoform C2 localizes to the apical plasma membrane via interactions with scaffolding protein, **J. Biochem.**, 149, 177–189 (2011)
- II-2 Emi, Y., Yasuda, Y., Sakaguchi, M. : A cis-acting five-amino acid motif controls targeting of ABCC2 to the apical plasma membrane domain, **J. Cell Sci.**, in press (2012)
- II-3 衣斐義一・阪口雅郎：Identification of a cytoplasmic signal for targeting of ABCC2 to apical plasma membrane, 第63回日本細胞生物学会大会 (札幌)、2011

II-4 衣斐義一・阪口雅郎：ABCC2 の apical 側細胞膜への局在化を制御するシグナルの解析、
第 84 回日本生化学会大会（京都）、2011

II-5 衣斐義一・阪口雅郎：A unique cis-acting motif in a cytoplasmic loop domain of the
ATP-binding cassette transporter isoform C2 (ABCC2) controls apical targeting、
第 34 回日本分子生物学会年会（横浜）、2011

大学院生命理学研究科

博士後期課程
藤田英伸

博士前期課程
坂口友紀
矢吹隆明
山岸麻里芙
阪上春花

科学研究費補助金等

- 1 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
- 2 科学研究費補助金（平成 23～25 年度） 基盤研究（B） 課題番号 23370055
研究課題 膜タンパク質の小胞体トランスロコンを介した膜組み込みと小胞体回避機構
研究代表者 阪口雅郎
- 3 科学研究費補助金（平成 23～24 年度） 若手研究（B） 課題番号 23770151
研究課題 哺乳類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
- 4 科学研究費補助金（平成 22～23 年度） 若手研究（B） 課題番号 22770153
研究課題 タンパク質小胞体膜透過ダイナミクスの一分子解析
研究代表者 山本 等
- 5 科学研究費補助金（平成 23～24 年度） 特研奨励 課題番号 23-6629
研究課題 小胞体膜トランスロコンにおけるタンパク質膜透過の動態
研究代表者 藤田英伸