

## 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、膜小器官の動態制御など、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、正確に膜に組み込まれ、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小胞体膜トランスロコンに対する膜コレステロールの効果を精査した。粗面小胞体膜にコレステロールを添加し、タンパク質の膜透過効率を無細胞系を用いて定量的に測定した結果、コレステロールはシグナル配列による小胞体標的化過程に加え、正電荷の透過の動きを抑制すること、疎水性配列の膜透過を効率化することを発見した。膜コレステロールは、トランスロコンチャネルのポリペプチド鎖輸送機能を阻止するほかに、疎水性配列の膜脂質への移行を抑制すると考えられた。

②無細胞系でのタンパク質合成に伴う新生ポリペプチド鎖の膜透過を調べる際に、膜結合リボソームからの新生鎖の解離が、伝令 RNA 上の終止コドンのみでは決まらず、その後方の数塩基が寄与することを発見した。終止コドン機能には、終止コドン後方の塩基配列が寄与することを示す。終止コドンのリボソーム活性部位への保持や、解離活性に下流配列が寄与すると示唆された。

③粗面小胞体トランスロコンにおける新生ポリペプチド鎖の膜透過を、正荷電リン脂質であるフォスファチジルセリン (PS) 結合性タンパク質 (ラクトアドヘリン) が阻害することを見出した。膜表面の PS に結合するタンパク質の添加によって、その負電荷が膜表面一部分の領域に隔離されえることによって正電荷の動きが亢進すると予想されたが、ポリペプチド鎖の配列によらず阻害されることが明らかになった。

## 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.

ヒトを含めて動物には、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、最後に代謝物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) トランスポーターに焦点を当て、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 MDCK 細胞と HepG2 細胞を使って構築し、極性局在化を決定するシグナル配列を明らかにした。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タンパク質を同定する作業が進展中である。また、生合成されたタンパク質が小胞体から運び出される段階ではたらく調節機構や、細胞膜から細胞内に取り込まれたタンパク質をリサイクルする機構に関して解析を進めている。

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 E<sup>295</sup>EVEALI<sup>301</sup> 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、L<sup>300</sup> と I<sup>301</sup> 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 Yamamoto, H., Fujita, H., Kida, Y. and Sakaguchi, M.: Pleiotropic effects of membrane cholesterol upon translocation of protein across the endoplasmic reticulum membrane, *Biochemistry*, 51, 3596-3605 (2012)
- I-2 Takahara, M., Sakaue, H., Onishi, Y., Yamagishi, M., Kida, Y. and Sakaguchi, M.: Tail-extension following the termination codon is critical for release of the nascent chain from membrane-bound ribosomes in a reticulocyte lysate cell-free system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430, 567-572 (2013)
- I-3 Yamamoto, H., Kida, Y., and Sakaguchi, M.: Phosphatidylserine-binding protein lactadherin inhibits protein translocation across the ER membrane, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 434, 620-626 (2013)
- I-4 Sakaue, H., Iwashita, S., Yuichiro Kida, Y. and Sakaguchi, M.: Analysis of N-terminal motif suppressing ER-targeting, ポスター、第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会 (神戸)、2012
- I-5 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ポリペプチド鎖の動き、ポスター、第 12 回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)、2012
- I-6 大西由希子・山岸麻里芙・藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎: リボソームは小胞体トランスロコンを介した膜貫通セグメントの形成を制御する、ポスター、第 12 回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)、2012
- I-7 木田祐一郎・矢吹隆明・藤田英伸・阪口雅郎: 小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質の構造形成、ワークショップ、第 12 回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)、2012
- I-8 Sakaguchi, M.: 小胞体トランスロコンを介した新生ポリペプチド鎖の動きの制御/ Dynamic behavior of nascent polypeptide chain through translocon regulated by positive charges, hydrophobic sequences, and ribosome, シンポジウム、第 12 回日本蛋白質科学会年会 (名古屋)、2012

- I-9 姜 公秀・高原教代・大西由希子・藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎：細胞内での小胞体トランスロコンにおけるタンパク質膜透過の一時停止を解析する、ポスター、第 85 回日本生化学会大会（福岡）、2012
- I-10 大西由希子・山岸麻里英・藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンにおけるポリペプチド鎖膜透過の速度論：少数の正電荷による膜透過減速効果、ポスター、第 85 回日本生化学会大会（福岡）、2012
- I-11 阪上春花・岩下昌平・木田祐一郎・阪口雅郎：膜タンパク質の小胞体標的化を抑制するアミノ末端モチーフの解析、ポスター、第 85 回日本生化学会大会（福岡）、2012
- I-12 藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体膜トランスロコンにおいて正電荷アミノ酸により引き起こされるポリペプチド鎖の逆方向への動き、ポスター、第 85 回日本生化学会大会（福岡）、2012
- I-13 木田祐一郎・石原裕大・藤田英伸・阪口雅郎：リボソーム-トランスロコン複合体における疎水性配列の識別機構、口頭発表・ポスター、第 85 回日本生化学会大会（福岡）、2012
- II-1 Emi, Y., Yasuda, Y. and Sakaguchi, M.: A cis-acting five-amino acid motif controls targeting of ABCC2 to the apical plasma membrane domain, *J. Cell Sci.*, 125, 3133-3143 (2012)
- II-2 衣斐義一・原田泰江・阪口雅郎：ABCC1 の basolateral 側細胞膜への極性局在化を制御するシグナルの解析、ポスター、第 85 回日本生化学会大会（福岡）、2012
- II-3 Emi, Y. and Sakaguchi, M.: Distinct cis-acting determinants in the first cytoplasmic loop domain control apicobasal distribution of the ATP-binding cassette transporter family C isoforms, ポスター、第 45 回日本発生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会（神戸）、2012

## 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  
阪上春花  
大西由希子  
姜 公秀

## 科学研究費補助金等

- 1 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
- 2 学術研究助成基金助成金（平成 24～25 年度） 挑戦的萌芽研究 課題番号 24657106  
研究課題 小胞体トランスロコンでのタンパク質輸送の一分子解析  
研究代表者 阪口雅郎
- 3 学術研究助成基金助成金（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 23～24 年度） 特別研究員奨励費 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
- 5 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 24 年度）  
研究課題 極性細胞が細胞膜の異なるドメインに異物排出ポンプを配置する機構の解明  
研究代表者 衣斐義一
- 6 兵庫県立大学特別教育研究助成金（平成 24 年度）  
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