

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タンパク質がリボソームで合成されてからオルガネラ膜を透過するまでの時間経過を定量的に見積もることが可能な実験系（フォールディングプローブ、CP-EGFP）を開発した。SFVのカプシドプロテアーゼ（CP）がリボソームから出るとすぐに立体構造を形成し、直後のペプチド結合を切断する特性を利用したものである。これを使って、さらに解析を進め、小胞体膜透過系で、新生鎖の正電荷クラスターが疎水性配列にかかわらず膜透過を停止させること、酵母細胞で翻訳完了後の膜透過装置と信じられてきた Sec71 や Sec72 遺伝子産物が翻訳共役型膜透過に必須であることや、これらがきわめて近い機能を有していることを示唆するデータを得た。現在、生細胞内でのタンパク質フォールディング挙動に対する膜透過関連遺伝子の作用を網羅的かつ定量的に解析している。②小胞体トランスロコンでの新生鎖ポリペプチド鎖の膜透過において、疎水性度が不十分な中度疎水性セグメントは、一方向的に移動するのみならず、前後に揺らぎながら、後方の疎水性配列の組み込みを許容することを見出した。単純な1回膜貫通型の膜貫通セグメントとは異なり、疎水性度が極端に低くとも膜貫通トポロジーを形成できるメカニズムの存在を示した。③ペルオキシソーム膜タンパク質に存在する、疎水性膜タンパク質の小胞体標的化回避モチーフについて、結合因子を分画し、その認識活性を追跡し、候補タンパク質を絞り込んだ。それらの質量分析を実行し、候補タンパク質の同定を行い、大腸菌での組み換え体の発現と精製を行った。それらについて、モチーフ配列との架橋評価を行い、唯一候補（A）が5位のセリン特異的に架橋することを見出した。「A」について新規因子としての特性解析を進めている。

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.

我々のからだには、ホルモンなどの体内で合成される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。肝臓で行われている生体防御反応は、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を明らかにすることを目標にして研究を進めている。

ABCC2 はグルクロン酸抱合体などを肝細胞から胆管へ排出する輸送体であり、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 と同じファミリーC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。同じ細胞膜であっても、このように極性の異なる局在化様式があるが、極性局在化を制御するしくみに関して全容解明から程遠いのが実状である。そこで、極性を示す局在化の制御のしくみを明らかにする研究を進めており、本年度は ABCC2 と同じ極性を示す ABCC7 を含めて以下の成果を得た。

①ABCC7 の部分ペプチドとの共発現による競争的な攪乱作用や部位特異的変異による局在に及ぼす影響を調べた結果、ABCC7 の極性局在化を規定するシグナルの候補の一つとして 57WDRE60 で表されるモチーフを見出した。

②ABCC2 の極性局在化を決定するシグナル配列の一つとして見出された S283QDAL287 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 ABCC2 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 ABCC2 をリサイクルする機構に関して解析を進めている。

③酵母ツーハイブリッド法によって ABCC2 のカルボキシ末端部に結合するタンパク質をスクリーニングし、その一つとしてクラスリン被覆小胞に付随するタンパク質として知られている NECAP1 を見出した。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた ABCC2 を細胞膜に再循環させる過程において、NECAP1 がはたらいていることを証明すべく研究を進めている。

発表論文 List of Publications

- I-1 Kang, K., Takahara, M., Sakaue, H., Sakaguchi, M. (2016)
Capsid protease domain as a tool for assessing protein-domain folding during organelle import of nascent polypeptides in living cells
J. Biochem., 159, 497-508 (DOI: 10.1093/jb/mvv129)
- I-2 Sakaue, H., Iwashita, S., Yamashita, Y., Kida, Y., Sakaguchi, M. (2016)
The N-terminal motif of PMP70 suppresses cotranslational targeting to the endoplasmic reticulum
J. Biochem., 159, 539-551 (DOI: 10.1093/jb/mvv132)
- I-3 Kida, Y., Ishihara, Y., Fujita, H., Onishi, Y. and Sakaguchi, M. (2016)
Stability and flexibility of marginally hydrophobic segments stalling at the endoplasmic reticulum translocon
Mol. Biol. Cell, 27, 930-940 (DOI: 10.1091/mbc.E15-09-0672)
- I-4 高橋千恵・大西由希子・木田祐一郎・柳谷耕太・河野憲二・阪口雅郎：リボソームによる新生鎖の感知とトランスロコンの機能制御（ポスター）、第15回日本蛋白質科学会年会（徳島）、2015
- I-5 吉村正太郎・大西由希子・木田祐一郎・阪口雅郎：マルチスパン膜タンパク質新生鎖のトランスロコンによるハンドリング（ポスター）、第15回日本蛋白質科学会年会（徳島）、2015
- I-6 阪上春花・木田祐一郎・阪口雅郎：合成途上のペルオキシソーム膜タンパク質の小胞体標的化を抑制する因子の精製（口頭発表・ポスター）、第67回日本細胞生物学会大会（東京）、2015
- I-7 姜公秀・吉久徹・阪口雅郎：翻訳共役型タンパク質膜透過における翻訳後膜透過因子 Sec71 及び Sec72 の寄与（口頭発表・ポスター）、第67回日本細胞生物学会大会（東京）、2015
- I-8 阪口雅郎：小胞体トランスロコンによる新生鎖のハンドリング（シンポジウム）、第53回日本生物物理学会年会（金沢）、2015
- I-9 姜公秀・吉久徹・阪口雅郎：翻訳共役型タンパク質膜透過における翻訳後膜透過因子 Sec71 p 及び Sec72 p の寄与（口頭発表・ポスター）、第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会（神戸）、2015
- I-10 阪上春花・斎藤一伸・木田祐一郎・岡田雅人・阪口雅郎：合成途上のペルオキシソーム膜タンパク質の小胞体標的化を抑制する因子の解析（ポスター）、第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会（神戸）、2015

I-11 木田祐一郎・藤田英伸・阪口雅郎：小胞体トランスロコンと膜組み込み途上にある新生ポリペプチド鎖との会合について（口頭発表・ポスター）、第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会（神戸）、2015

I-12 Kida, Y., Ishihara, Y., Fujita, H., Onishi, Y. and Sakaguchi, M. : Stability of Marginally Hydrophobic Segments Stalling at the ER Translocon(Short talk & poster), Gordon Research Conference on Membrane Protein Folding "Biology, Disease, Design and Theory" (Waltham, MA USA), 2015

II-1 衣斐義一・阪口雅郎：ABCC7/CFTRのapical側細胞膜への標的化シグナルの探索（口頭発表・ポスター）、第67回日本細胞生物学会大会（東京）、2015

II-2 衣斐義一・阪口雅郎：ABCC7/CFTRをapical側細胞膜へ標的化させるシグナルの探索（ポスター）、第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会（神戸）、2015

大学院生命理学研究科

博士後期課程

阪上 春花
姜 公秀

博士前期課程

高橋 千恵
吉村正太郎

科学研究費補助金等

- 1 科学研究費補助金（平成26～27年度） 新学術領域研究 課題番号：26117724
研究課題 オルガネラ分化を実現する膜タンパク質の選別輸送機構の階層性と相互干渉
研究代表者 阪口雅郎
- 2 学術研究助成基金助成金（平成26～27年度） 挑戦的萌芽研究 課題番号：26650063
研究課題 小胞体回避モチーフ作用因子の同定への挑戦
研究代表者 阪口雅郎
- 3 学術研究助成基金助成金（平成27～28年度） 新学術領域研究 課題番号：15H01541
研究課題 リボソームとトランスロコンの協調による新生鎖の膜組み込み機構の解明
研究代表者 阪口雅郎
- 4 兵庫県立大学特別研究助成金（平成27年度）
研究課題 膜タンパク質構造形成における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