

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・藤田英伸・衣斐義一
Sakaguchi, M., Fujita, H., 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ン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）を駆使して、膜透過関連遺伝子の作用の網羅的かつ定量的な解析を進めてきた。トランスロコン関連遺伝子として、小胞体内腔 Hsp70 である Kar2p の存在量に依存して、疎水性セグメントのトランスロコンにおける膜透過動きが向上すること、Kar2p の点変異体の追加発現によって強いドミナントネガティブ作用が見られることを見出した。さらに、Kar2p の、ATP 結合、リン酸加水分解、基質結合領域、J-タンパク質結合領域、ドメイン間ヒンジ領域など、各機能ドメインの点変異をの論点整理、変異体デザイン、構築をほぼ完了した。今後その表現型を、合成共役型タンパク質膜透過、合成完了後型透過、C-末端アンカー型膜組み込みに関する影響などの点について詳細に解析する。②合成共役型タンパク質膜透過の駆動作用の作用点の解析：合成後に進行するポリペプチド鎖の膜透過においては、Kar2p は Hsp70 のシャペロン作用サイクルを介してラチェット機能を発揮して駆動すると信じられている。一方、合成後型膜透過では、ポリペプチド鎖の伸長自体が駆動力として有効であり、ラチェット作用の貢献する余地がないと考えられているため、合成共役型膜透過における Kar2p の作用ドメインの解析が必要であった。そこで、Kar2p のドミナントネガティブ作用を示す点変異体について、そのネガティブ効果を消失する第 2 の変異、すなわち分子内抑圧変異の探索を進めている。これにより、合成共役型の膜透過における複数の Kar2p の作用点が明らかになるものと期待される。③膜タンパク質のトポロジーを規定する正電荷配列の作用機構の解析：これまでポリペプチド鎖上の正電荷残基がトランスロコンにおける膜透過を抑制することによって複雑な膜タンパク質の分子配向や膜貫通トポロジーが規定されることを明らかにしてきた。ここでは、正電荷残基を識別するトランスロコン側の要因を解明するために、トランスロコン本体分子 Sec61p および第 2 のトランスロコンチャンネルである Ssh1p について、系統的変異を導入し、正電荷配列部分の合成共役型膜透過状況を調べている。正電荷配列の透過効率変動が、多数の変異株について観察されており、その効果を疎水性領域の透過状況、小胞体への標的化速度状況などの諸点についても詳細を解析していく。

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、体内で合成されるホルモンなどの生理活性物質のほか、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異物代謝経路は、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。ビリルビン为例にとると、ビリルビンの蓄積によって黄疸を引き起こし、重症例では神経核などが障害される。血中のビリルビンは、肝細胞の類洞側細胞膜にある輸送体 (OATP1B1 および OATP1B3) によって取り込まれ、小胞体にある UDP-グルクロン酸転移酵素によってグルクロン酸抱合され、肝細胞の胆管側細胞膜にある輸送体 (ABCC2) によって排出される。これらのタンパク質の機能や局在化を正常に保つことによって、ビリルビンの体内濃度が低く保たれている。

当研究室では、排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターに焦点を当て、生合成されたタンパク質の局在や機能を制御するしくみを解き明かし、化学物質に対する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きた。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。ABCC2 と同じファミリー C に分類される ABCC1 と OATP1B1 および OATP1B3 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、極性局在化の制御を明らかにする研究を進めている。

① ABCC2 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、283 番目のセリンから始まる配列 (SQDAL) と結合するタンパク質を、酵母ツーハイブリッド法により見出しており、生合成された ABCC2 を細胞膜に標的化させる機構を明らかにする研究を進めている。

② 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。

③ 17 回膜貫通型の ABCC2 と同じファミリー C に分類される ABCC4 や ABCC7 は、12 回膜貫通型でアミノ酸の数やドメインの構成が異なっている。上皮細胞の頂端側の細胞膜に局在化する 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、57 番目のトリプトファンから始まる配列 (WDRE) で表されるモチーフを見出した。また、ABCC7 と同じ 12 回膜貫通型の ABCC4 の局在化シグナル (WDKE) を見出した。

④ OATP1B1 および OATP1B3 の極性局在化を決定する仕組みを解明する研究が進行中である。

発表論文 List of Publications

- I-1 川井 拓哉, 小坂 優里菜, 阪口 雅郎「酵母小胞体内腔 HSP70(KAR2) の合成共役型膜透過における作用機構の系統的解析」第 45 回日本分子生物学会年会分子生物学会 (2022 年、千葉・幕張メッセ)
- I-2 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形成時のタンパク質の動態の解明」第 45 回日本分子生物学会年会分子生物学会 (2022 年、千葉・幕張メッセ)
- II-1 Haque MS, Emi Y, Sakaguchi M., "A conserved WXXE motif is an apical delivery determinant of ABC transporter C subfamily isoforms." Cell Struct. Funct. 48, 71–82 (2023)
- II-2 福田 昂輝, 衣斐 義一, ハック モハンマド=シャジェドオル, 阪口 雅郎「有機アニオントランスポーターOATP1B3 の側底部細胞膜への極性局在化シグナルの探索」第 45 回日本分子生物学会年会分子生物学会 (2022 年、千葉・幕張メッセ)

大学院生命理学研究科

博士後期課程

Md Shajedul Haque

生命科学専攻

博士前期課程

松本侑子

川井拓哉

科学研究費補助金等

- 1 学術研究助成基金助成金 (令和 2 年度～令和 4 年度) 基盤研究 C (一般)
課題番号 20K06510
研究課題 膜タンパク質の構造構築過程に関わるトランスロコン因子群の機能解明
研究代表者 阪口雅郎
- 2 (公財) 武田科学振興財団 (令和 2 年度～令和 4 年度)
研究課題 小胞体・ゴルジ体ストレス応答を軸とした新規創薬戦略の基盤構築
研究分担者 阪口雅郎
- 3 学術研究助成基金助成金 (令和 4 年度～令和 6 年度) 基盤研究 C (一般)
課題番号 22K06116
研究課題 小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質形成時のタンパク質の動態の解明
研究代表者 藤田英伸