

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というバリアによって仕切られており、それぞれ独自の成分を集積することで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・維持といった機能を担っており、生命に必須の存在である。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、正しい膜内外の方向性（膜トポロジー）で膜に組み込まれ、立体構造を形成して初めて機能を発揮できる。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。本年度の進展状況は、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、最も上流に位置する小胞体において、合成と共役的に膜へと組み込まれる。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、リボソームから出てきた膜貫通配列は、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。I型シグナルアンカー（SA-I）配列は、アミノ末端側をオルガネラ内腔に配置して貫通状態となるタイプの膜貫通配列である。アミノ末端側ドメインの膜透過は、リボソームのポリペプチド鎖伸長反応に伴った膜透過とは異なり、後に続く SA-I 配列までが合成されリボソームから露出した後に起こる。この膜透過に働く駆動力の定量法を確立した。SA-I 配列の改変、並びに SA-I 配列からの距離に応じて駆動力が変動することを示した。この結果は、SA-I 配列が膜透過を直接駆動する可能性を示す。SA-I 配列疎水性コアの脂質環境への移行と膜透過の関係について現在解析中である。②上述ポリペプチド鎖伸長反応に伴った膜透過途中で疎水性配列が出現した場合、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も存在する。疎水性配列の下流に正荷電アミノ酸残基が存在した場合、この膜組み込みに促進的に作用することが分かっている。この正電荷の作用について系統的に調べたところ、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。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ペルオキシソームの ABC 輸送体 PMP70 は、細胞質遊離リボソームで合成された後に局在化する。膜貫通配列のような疎水性に富んだ配列は、小胞体標的化シグナルとなりうるが、PMP70 のアミノ末端領域には、その小胞体標的化を阻害する配列が存在することが分かった。PMP70 分子内部には、これとは別にペルオキシソーム局在化配列も存在するが、正確な局在化を保障するシステムとして機能す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で摂取した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 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および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 ABCC2 は、肝細胞において血管側でなく胆管側の細胞膜に極性をもって局在する。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、この現象を詳しく解析することによって局在化シグナルを同定することを進めている。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いる。

発表論文 List of Publications

- I-1 Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M. : Signal-anchor sequence provides motive force for polypeptide-chain translocation through the ER membrane, *J. Biol. Chem.*, 284, 2861–2866 (2009)
- I-2 Kashiwayama, Y., Seki, M., Yasui, A., Murasaki, Y., Morita, M., Yamashita, Y., Sakaguchi, M., Tanaka, Y., Imanaka, T. : 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH₂-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins, *Exp. Cell Res.*, 315, 190-205 (2009)
- I-3 阪口雅郎・木田祐一郎：膜タンパク質の膜組み込みとトランスロコンの柔軟性、生化学、80、897-906 (2008)
- I-4 阪口雅郎：シグナル仮説、シグナル認識粒子、膜蛋白質のトポロジー形成、キーワード：蛋白質の一生（蛋白質核酸酵素 6 月号増刊）、53 (2008)
- I-5 Masao 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)
- I-6 藤田英伸・木田祐一郎・森本富美子・阪口雅郎：正荷電アミノ酸残基による小胞体膜透過制御、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回分子生物学会大会合同（神戸、2008 年）
- I-7 木田祐一郎・久米千智・平野真希・阪口雅郎：膜貫通配列の小胞体膜組み込みダイナミクス、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回分子生物学会大会合同（神戸、2008 年）
- I-8 岩下昌平・山下ゆかり・木田祐一郎・阪口雅郎：PMP70 の N-末端に存在する小胞体標的化抑制モチーフ、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回分子生物学会大会合同（神戸、2008 年）
- I-9 佃美和・岩下昌平・土田雅史・小森雅之・木田祐一郎・阪口雅郎：ペルオキシソーム ABC 輸送体におけるオルガネラ標的化シグナルの階層構造、第 81 回日本生化学会大会・第 31 回分子生物学会大会合同（神戸、2008 年）
- I-10 Kida, Y., Kume, C., Hirano, M., and Sakaguchi, M. : Lateral movement of a signal-anchor sequence from translocon to lipid environment, EMBO conference series “Control, Co-ordination and Regulation of Protein Targeting and Translocation”, Sainte-Maxime (France, 2008)
- I-11 木田祐一郎・久米千智・平野真希・阪口雅郎：膜貫通配列のトランスロコンを介した水平方向のダイナミクス、第 8 回日本蛋白質科学会大会（東京、2008 年）
- II-1 Emi, Y., Ikushiro, S., and Kato, Y. : Thyroxine-metabolizing rat UGT1A7 is regulated by thyroid hormone receptor, XIIth International Workshop on Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferase (Canada, 2008)

II-2 衣斐義一・百合川 圭・阪口雅郎：ヒト ABCC2 (MRP2) の HepG2 細胞内での極性局在化、
第 81 回日本生化学会大会・第 31 回分子生物学会大会合同（神戸、2008 年）

II-3 Kishi, M., Emi, Y., Sakaguchi, M., Ikushiro, S., and Iyanagi, T. : Ontogenic isoform
switching of UDP-glucuronosyltransferase family 1 in rat liver, *Biochem. Biophys. Res.
Commun.*, 377, 815-819 (2008)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

青木 圭

佐野友紀

福井 優

坂口友紀

岩下昌平

藤田英伸

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 科学研究費補助金（平成 19～20 年度） 若手研究(B) 課題番号 18770095

研究課題 小胞体トランスロコンを介した膜トポロジー形成機構

研究代表者 木田祐一郎

4 科学研究費補助金（平成 19～20 年度） 特定領域研究 課題番号 19036030

研究課題 膜タンパク質の局在化と構造形成におけるソフトな相互作用

研究代表者 木田祐一郎

5 科学研究費補助金（平成 19～20 年度） 特定領域研究 課題番号 19042019

研究課題 膜タンパク質構造形成におけるダイナミクスの解明

研究代表者 木田祐一郎

6 財団法人住友財団 2008 年度基礎科学研究助成

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

研究者 木田祐一郎