

## 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）を取り囲む生体膜に埋まり込んで存在する膜タンパク質は、膜内外の物質輸送・情報交換、エネルギー産生を含む膜付近での諸反応、膜構造の形成・維持など、生命に必須の機能を担っている。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、各膜貫通配列が正しい膜内外の方向性（膜トポロジー）で膜に組み込まれ、更に機能的高次構造をとって初めて作用できる。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機構、並びに小胞体タンパク質膜透過チャネル（トランスロコン）を介した膜タンパク質の組み込み機構をターゲットとして研究を行っており、本年度は以下の成果が得られた。

①小胞体、ゴルジ体、リソソーム、細胞膜など、いわゆる細胞分泌経路上の膜タンパク質は、小胞体で膜に組み込まれた後各オルガネラへと輸送される。粗面小胞体ではリボソームとトランスロコンが直接結合し、翻訳と共役した形でタンパク質の膜透過及び膜組み込みが行われる。透過中のポリペプチド鎖上に高い疎水性の配列が現れると、トランスロコンで停止し脂質環境へと横方向に分配されて膜貫通配列となる。一方、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を配置することで膜透過停止するが、低疎水性配列の 60 残基下流の正電荷配列が膜透過停止に寄与できること、またこの場合低疎水性配列は一過的に小胞体内腔へと透過するが、下流の正電荷配列によって膜内への逆戻りが誘導されることが示唆された。トランスロコンにおけるポリペプチド鎖の動きや各配列の認識機構に示唆を与える発見である。

②また、上述の低疎水性配列の小胞体内腔への到達は配列付近に導入したアスパラギン結合型糖鎖付加モチーフへの糖鎖付加により検出したが、この糖鎖付加により膜透過停止が著しく阻害された。このことは、糖鎖が立体的障害となり低疎水性配列の膜内への逆戻りを阻害することを示唆している。タンパク質の膜透過及び膜透過停止が糖鎖付加によっても制御される可能性が示された。

③ペルオキシソームの ABC 輸送体 PMP70（6 回膜貫通タンパク質）は、細胞質で合成された後に局在化する。アミノ末端約 80 残基の親水性配列及びそれに続く 1 番目及び 2 番目の膜貫通配列までの部分だけでペルオキシソームへと正確に局在化するが、アミノ末端親水性配列のみではミトコンドリ

ア、2本の膜貫通配列のみでは小胞体に局在化することが分かった。これらの配列が複合的に作用することでペルオキシソームへと局在化することが示唆された。

## 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.

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 の極性局在化機構を解析する実験系を肝臓由来の 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複数の局在化シグナルの候補配列を見出した。また、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おり、現在のところ結合タンパク質を同定する作業が進展中である。

### 発表論文 List of Publications

- I-1 Yamagishi, M., Fujita, H., Morimoto, F., Kida, Y., 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-2 Fujita, H., Kida, Y., Hagiwara, M., Morimoto, F., Sakaguchi, M.: Positive charges of translocating polypeptide chain retrieve an upstream marginal hydrophobic segment from ER lumen to translocon, *Mol. Biol. Cell*, 21, 2045-2056 (2010)
- I-3 Iwashita, S., Tsuchida, M., Tsukuda, M., Yamashita, Y., Emi, Y., Kida, Y., Komori, M., Kashiwayama, Y., Imanaka, T., Sakaguchi, M.: Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70, *J. Biochem.*, 147(4), 581-590 (2010)
- I-4 Sakaguchi, M.: Dynamic action of positive charges on nascent polypeptide chain translocating through translocon, *The 3rd International Symposium on Protein Community (Nara) 2010*
- I-5 Fujita, H., Kida, Y., Yamagishi, M., Hagiwara, M., Sakaguchi, M. : Positive charges in translocating polypeptide chain regulate the movement through translocon, *The 3rd International Symposium on Protein Community, poster (Nara) 2010*
- I-6 Kida, Y., Fujita, H., Kume, C., Hirano, M., Sakaguchi, M. : Environmental Transition of Transmembrane Sequences during Membrane Insertion via the ER Translocon , *The 3rd International Symposium on Protein Community, poster (Nara) 2010*
- I-7 Yabuki, T., Kida, Y., Morimoto, F., Sakaguchi, M., : Exposure of Transmembrane Segments and Luminal Loops within Multi-Spanning Membrane Protein to the Cytosol during Integration into the ER Membrane, *The 3rd International Symposium on Protein Community, poster (Nara) 2010*
- I-8 矢吹隆明・木田祐一郎・森本富美子・阪口雅郎：ストレプトアビジン結合性タグ配列を利用した膜貫通配列の組み込み解析、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、ポスター・トーク（神戸）2010
- I-9 山岸麻里英・藤田英伸・森本富美子・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンにおける膜貫通セグメント形成のダイナミクス、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、ポスター（神戸）2010
- I-10 藤田英伸・山岸麻里英・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンを介したタンパク質の膜透過は正電荷によって一時停止する、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、ポスター（神戸）2010

- I-11 木田祐一郎・丸山浩樹・西村 紀・亀村和昌・阪口雅郎：小胞体トランスロコン関連因子 Sec62・Sec63 の機能解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、ポスター（神戸）2010
- I-12 本多佑輔・佃 美和・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンにおけるシグナル配列・シグナルペプチダーゼ・糖転移酵素の相対配置、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、ポスター（神戸）2010
- I-13 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膜組み込みと構造形成、日本膜学会第 32 年会・生体膜関連シンポジウム「膜と膜機能の可視化」、（東京）2010
- I-14 阪口雅郎：細胞内での膜タンパク質の形づくり、第 4 回分子科学会シンポジウム、セッション (1) ミクロ～メソ～マクロを繋ぐ「形」が立ち現れる仕組み、（東京）2010
- I-15 藤田英伸・山岸麻里美・木田祐一郎・阪口雅郎：トランスロコンを通るポリペプチド鎖の動きは正荷電アミノ酸残基で減速する、第 10 回日本蛋白質科学会年会、ポスター（札幌）2010
- I-16 藤田英伸・木田祐一郎・萩原誠智・森本富美子・阪口雅郎：弱疎水性配列と正荷電アミノ酸残基の協調作用による小胞体膜透過停止機構、第 10 回日本蛋白質科学会年会、ポスター（札幌）2010
- I-17 本多佑輔・岩下昌平・山下ゆかり・佃 美和・木田祐一郎・阪口雅郎：ペルオキシソーム膜タンパク質 PMP70 の N 末端モチーフは TM1 の ER 標的化を抑制する、第 62 回日本細胞生物学会大会、ポスター（大阪）2010
- 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 衣斐義一・阪口雅郎：Localization of ATP-binding Cassette Transporter Isoform C2 (ABCC2) to Apical Plasma Membrane through Interaction with PDZK1 Scaffolding Protein, 第 62 回日本細胞生物学会大会、ポスター（大阪）2010
- II-3 衣斐義一・阪口雅郎：Regulation of Apical Localization of Human ABCC2 in Polarized Hepatocytes, 第 25 回日本薬物動態学会年会、ポスター（さいたま市）2010

- II-4 衣斐義一・保田裕貴・阪口雅郎：ヒト ABCC2 の極性局在化を HepG2 細胞で制御するシグナルの解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、ポスター（神戸）2010

## 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

年未裕輔

矢吹隆明

山岸麻里英

## 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 21～22 年度） 若手研究（B） 課題番号 21770123  
研究課題 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 財団法人ひょうご科学技術協会助成金（平成 22 年度）  
研究課題 小胞体における膜タンパク質構造形成機構の解析  
研究代表者 木田祐一郎
- 6 兵庫県立大学特別教育研究助成金 奨励研究（平成 22 年度）  
研究課題 小胞体タンパク質膜透過・組み込み装置の機能解析  
研究代表者 木田祐一郎