

## 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。

アミノ末端側を膜透過に導くタイプのシグナルアンカー配列（I型シグナルアンカー配列、SA-I）について、その膜透過駆動作用をタンパク質リガンドを介して抑止するために必要な親和性相互作用を見積もることに成功した。また SA-I 作用による強制的膜組み込み機構が、赤血球の陰イオン交換輸送体であるバンド3膜タンパク質の複数の膜貫通セグメントの形成において寄与することを明らかにした。我々が発見し、特性解析を続けてきた SA-I 機構の重要性がさらに明確になってきた。

ポリペプチド鎖の合成に共役した膜組み込みにはリボソームに直結したトランスロコンが関わる。中度疎水性を持つ配列の膜組み込みを無細胞系で詳細に検討したところ、その配列を含むポリペプチド鎖のカルボキシル末端がリボソームの合成中心に結合しているときと、終止コドンによってリボソームから解離したときとで、疎水鎖のトランスロコンにおける振る舞いに違いがあることを発見した。トランスロコンに合成途上のリボソームが結合している場合には、中度疎水性配列は安定に膜透過停止せず、膜透過可能な状態にある。リボソームによってトランスロコン機能が制御されているとする新たな仮説を提案した。

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が、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（ラクトカドヘリン）によって阻害されることを見出した。

## 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 の極性局在化を決定するシグナル配列の一つとして、S<sup>283</sup>QDAL<sup>287</sup>を見出した。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 のアミノ酸配列に含まれ、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。

③ABCC2 のカルボキシ末端部に結合するタンパク質を、酵母ツーハイブリッド法によってスクリーニングし、その一つとしてクラスリン被覆小胞と結合することが知られている NECAP1 を見出した。現在のところ、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 がはたらくし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 Yabuki, T., Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M. : Membrane translocation of luminal domains of membrane proteins powered by downstream transmembrane sequences, *Mol. Biol. Cell*, 24, 3123-3132 (DOI: 10.1091/mbc.E13-04-0210.) (2013)
- I-2 Onishi, Y., Yamagishi, M., Imai, K., Fujita, H., Kida, Y., and Sakaguchi, M. : Stop-and-move of a marginally hydrophobic segment translocating across the endoplasmic reticulum membrane, *J. Mol. Biol.*, 425, 3205-3216 (DOI: 10.1016/j.jmb.2013.05.023.) (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 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.131.) (2013)
- I-4 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 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.112) (2013)
- I-5 大西由希子・山岸麻里芙・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膜貫通セグメントの膜組み込みはリボソームによって維持される可動性準安定状態を経由する 第 86 回日本生化学会大会口頭発表・ポスター(横浜)、2013
- I-6 木田祐一郎・石原裕大・藤田英伸・阪口雅郎：膜透過途上にあるポリペプチド鎖と小胞体トランスロコンとの相互作用解析 第 86 回日本生化学会大会口頭発表・ポスター(横浜)、2013
- I-7 木田祐一郎・石原裕大・藤田英伸・阪口雅郎：粗面小胞体上のリボソームが膜貫通配列を認識する 第 65 回日本細胞生物学会大会・ポスター、シンポジウム「細胞の中の生々流転-「もの」の動態に基づく機能制御」(名古屋)、2013
- I-8 大西由希子・山岸麻里芙・藤田英伸・木田祐一郎・阪口雅郎：タンパク質膜透過におけるトランスロコン内での疎水性セグメントの準安定な保持について 第 13 回日本蛋白質科学会年会・ポスター(鳥取)、2013

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：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検出する方法論の開発とその有用性 第13回日本蛋白質科学会年会・ポスター(鳥取)、2013

II-1 Emi, Y., Harada, Y., and Sakaguchi, M.: Involvement of a di-leucine motif in targeting of ABCC1 to the basolateral plasma membrane of polarized epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441, 89-95 (DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.013.) (2013)

II-2 衣斐義一・阪口雅郎：上皮細胞において ABCC1 と ABCC2 の極性局在化を制御するシグナルの解析 第86回日本生化学会大会・ポスター(鳥取)、2013

II-3 松岡絢香・横山雄一・衣斐義一・阪口雅郎：ABCC2 の apical 側細胞膜への極性輸送の制御に関わるシステイン残基 第65回日本細胞生物学会大会・ポスター(名古屋)、2013

## 大学院生命理学研究科

博士後期課程

阪上春花

博士前期課程

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