

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、小胞体膜透過系では、CPドメインは細胞質でフォールドし得ないこと、ミトコンドリアへのタンパク質輸入では、細胞質でCPドメインのフォールディングが可能なことが判明した。すなわちミトコンドリアへのタンパク質輸入の場合には、ポリペプチド鎖の伸長と膜透過が小胞体ほど強く共役していないことが実証された。また、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を生細胞内で実証した。生細胞内でのタンパク質フォールディング挙動を解析するのに有用な手法である。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可能にできることを実証した。シングルスパン膜タンパク質の貫通セグメントほどは疎水性度が無くても膜貫通トポロジーを形成できる新規メカニズムを提唱するものである。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することが可能になった。これを使って、このモチーフ作動性タンパク質因子の候補を絞り込んだ。質量分析によって候補タンパク質の同定を行い、いくつかについて大腸菌にて発現させ、結合活性などを解析中である。

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.

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。

ABCC2 は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。本年度は、ABCC2 と同じ極性を示す ABCC7 を含め、以下の成果を得た。

①ABCC7 の極性局在化を規定するシグナルの候補の一つとして、ドミナントネガティブ変異体との共発現による攪乱作用や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、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 Yamagishi, M., Onishi, Y., Yoshimura, S., Fujita, H., Imai, K., Kida, Y. and Sakaguchi, M.: A few positively charged residues slow movement of a polypeptide chain across the endoplasmic reticulum membrane, *Biochemistry*, 53, 5375-5383 (DOI:10.1021/bi500649y.) (2014)
- I-2 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：リボソームは伸長直後のポリペプチド鎖の配列をトンネル内で感知しトランスロコンの機能を制御する（ポスター）、第66回日本細胞生物学会大会（奈良）、2014
- I-3 阪上春花・木田祐一郎・阪口雅郎：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探索（ポスター）、第66回日本細胞生物学会大会（奈良）、2014
- I-4 木田祐一郎・石原裕大・藤田英伸・阪口雅郎：小胞体トランスロコンによる疎水性配列の識別及び膜内配置機構の解析（ポスター）、第14回日本蛋白質科学会年会（横浜）、2014
- I-5 木田祐一郎・石原裕大・藤田英伸・阪口雅郎：小胞体トランスロコンにおける疎水性配列の動的な膜透過停止について（口頭発表、ポスター）、第87回日本生化学会大会（京都）、2014
- I-6 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：リボソームトンネル内の新生鎖がトランスロコン内の疎水性配列の動きに影響する（ポスター）、第87回日本生化学会大会（京都）、2014
- I-7 高原教代・藤田英伸・宇山侑希・木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコンにおける新生鎖の動き駆動要因（ポスター）、第87回日本生化学会大会（京都）、2014
- I-8 吉村正太郎・大西由希子・木田祐一郎・阪口雅郎：親水性セグメントによるトランスロコンの占有と後続 TM の膜組み込み阻止（ポスター）、第87回日本生化学会大会（京都）、2014
- II-1 衣斐義一・畠 靖子・青木 圭・阪口雅郎：細胞内に取り込まれた ABCC2 の apical 側細胞膜への再局在化と NECAP1 の関連（ポスター）、第66回日本細胞生物学会大会（奈良）、2014
- II-2 衣斐義一・畠 靖子・阪口雅郎：A clathrin accessory protein NECAP1 directs internalized ABCC2 to the apical plasma membrane in HepG2 cells（ポスター）、第87回日本生化学会大会（京都）、2014

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 (財)ひょうご科学技術協会助成金（平成 26 年度）
研究課題 真核細胞における ABC 輸送体のオルガネラ選別輸送
研究代表者 阪口雅郎