

## 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）を駆使して、生細胞の小胞体における膜タンパク質フォールディング挙動に対する膜透過関連遺伝子の作用の網羅的かつ定量的な解析に着手した。トランスロコン関連遺伝子で、その破壊によって小胞体標的化機構の変換が起きるもの、疎水性配列の透過に影響するもの、正電荷配列の透過に影響の出るものを複数種見出した。小胞体標的化については、リボソーム結合シャペロン複合体（RAC）欠損によって伸長共役型の標的化効率が格段に向上することが判明した。SSB1 遺伝子産物関連のシャペロン因子が SRP による認識機構を抑圧していることが示唆された。また、小胞体内腔の分子シャペロンネットワーク系が疎水性配列の動きに影響することを示した。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許容することを見出した。単純な 1 回膜貫通型の膜貫通セグメントとは異なり、疎水性度が極端に低くとも膜貫通トポロジーを形成できるメカニズムの存在を示し、これらの配列のトランスロコンでの存在位置を特定した。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、唯一候補（A）が 5 位のセリン特異的に架橋することを見出した。「A」について新規因子としての特性解析を進め、そのノックダウンによって、小胞体標的化が見られなくなることを実証した。

## 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.

我々のからだには、ホルモンなどの体内で合成される生理活性物質のほか、食物や水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。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、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。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。

①ABCC2 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同定する作業が進展中であり、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 がはたらいっていることを証明すべく研究を進めている。

③17 回膜貫通型の ABCC2 と同じファミリーC に分類される 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。ABCC7 は上皮細胞の頂端側の細胞膜に局在化するが、ABCC7 の部分ペプチドとの共発現による競争的な攪乱作用や部位特異的の変異による局在に及ぼす影響を調べた結果、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 の局在化シグナルを同定する作業も進行中である。

## 発表論文 List of Publications

- I-1 阪口雅郎：The N-terminal motif of peroxisomal membrane protein PMP70 is ER-targeting suppressor(ETS) (ペルオキシソーム膜タンパク質 PMP70 の N 末端モチーフは小胞体標的化抑制機能 (ETS) を持つ) (ポスター)、第 17 回日本蛋白質学会年会 (仙台)、2017
- I-2 木田祐一郎・阪口雅郎：小胞体トランスロコン配列認識部位の特定に向けて (口頭発表・ポスター)、第 17 回日本蛋白質科学会年会 (仙台)、2017
- I-3 菅 公秀・十倉麻友子・吉久 徹・阪口雅郎：新規フォールディングプローブを用い小胞体膜透過チャンネルでの新生鎖透過動態が変動する出芽酵母遺伝子の探索 (ポスター)、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台)、2017
- I-4 十倉麻友子・塩見裕子・菅 公秀・阪上春花・吉久 徹・阪口雅郎：新規フォールディングプローブで明らかになった小胞体膜透過因子 Sec71p/Sec72p の新たな機能 (ポスター)、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台)、2017
- I-5 阪口雅郎・高原教代・森川真衣・實澤雅也・阪上春花：膜タンパク質の小胞体標的化を抑制する機能モチーフ (ETS) と作用因子 (口頭発表・ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017
- I-6 十倉麻友子・小坂優里菜・中川知香・高原教代・菅 公秀・阪口雅郎：CP-フォールディングプローブによる小胞体トランスロコンにおける伸長透過共役因子の解析 (ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017
- I-7 木田祐一郎・阪口雅郎：通過途上の疎水性配列と相互作用する Sec61 トランスロコン内部位のマッピング (口頭発表・ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017
- II-1 衣斐義一・阪口雅郎：細胞内に取り込まれた ABCC2 の NECAP1 による apical 側細胞膜への再局在化 (口頭発表・ポスター)、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台)、2017
- II-2 衣斐義一・阪口雅郎：ABCC7/CFTR を細胞膜の apical 側への標的化させるシグナルの探索 (ポスター)、第 90 回日本生化学会大会 (神戸)、2017

## 大学院生命理学研究科

博士後期課程

菅 公秀

博士前期課程

十倉麻友子

## 科学研究費補助金等

- 1 学術研究助成基金助成金（平成 28～30 年度） 挑戦的萌芽研究 課題番号：16K14730  
研究課題 膜タンパク質小胞体回避モチーフ作用因子の機能解明への挑戦  
研究代表者 阪口雅郎
- 2 科学研究費補助金（平成 28～30 年度） 基盤研究 B 課題番号：16H04766  
研究課題 膜タンパク質構造形成装置としての小胞体トランスロコンの機能解明  
研究代表者 阪口雅郎
- 3 科学研究費補助金（平成 29～30 年度） 新学術領域研究 課題番号：17H05673  
研究課題 膜タンパク質の伸長途上鎖をハンドリングする分子機構の解明  
研究代表者 阪口雅郎
- 4 学術研究助成基金助成金（平成 29～31 年度） 基盤研究 C 課題番号：17K07389  
研究課題 マルチスパン膜タンパク質構造形成における小胞体トランスロコン機能解析  
研究代表者 木田祐一郎