

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、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。特に **SSZ1** 欠損によって標的化効率が向上することを見出した。また、小胞体内腔で **Hsp70** である **Kar2p** の存在量によって疎水性セグメントの動きが向上することを見出し、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「第2サイト」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、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。候補AはN-末端ミリスチル化酵素であることを明らかにした。

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、排出に関わる ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターに焦点を当て、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。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 (WDKE) を見出した。

発表論文 List of Publications

I-1 Kida, Y., Sakaguchi, M.

Interaction mapping of the Sec61 translocon identifies two Sec61a regions interacting with hydrophobic segments in translocating chains.

J. Biol. Chem., 293 (44), 17050-17060 (doi: 10.1074/jbc.RA118.003219), 2018

I-2 阪口雅郎・高原教代・藤田英伸 : Two independent modes of recognition of hydrophobic segment at the endoplasmic reticulum translocon (小胞体トランスロコンでの膜タンパク質の構造形成における膜貫通セグメント識別の2つの容態) (口演)、第18回日本蛋白質学会年会(新潟)、2018

I-3 藤田英伸・高原教代・阪口雅郎 : Dynamic motion of nascent chain through the ER translocon with back and forth movement (ポスター)、国際シンポジウム Proteins (滋賀)、2018

I-4 菅公秀、吉久徹、阪口雅郎 : Folding probe reveals effects of translocon-related genes knockout on co-translational protein translocation in budding yeast cells (ポスター)、国際シンポジウム Proteins (滋賀)、2018

I-5 藤田英伸, 高原教代, 木田 祐一郎, 阪口 雅郎:小胞体トランスロコンでのポリペプチド鎖の動き制限要因と駆動要因 (口演・ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-6 菅公秀, 十倉麻友子, 吉久徹, 阪口雅郎:小胞体膜透過因子 Sec71p/Sec72p の作用機序の解明(ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-7 中川知香, 菅公秀, 吉久徹, 阪口雅郎 : リボソーム結合型分子シャペロン Hsp70 の合成共役型膜透過に対する作用 (口演・ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-8 森川真衣, 高原教代, 阪口雅郎 : 膜タンパク質小胞体標的化抑制 (ETS) 因子としてのミスチル転移酵素 NMT1 (口演・ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-9 小坂優里菜, 菅公秀, 吉久徹, 阪口雅郎:粗面小胞体での合成共役型タンパク質膜透過に内腔シャペロンネットワークが関与する (ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

I-10 菅公秀、吉久徹、阪口雅郎 : 出芽酵母小胞体におけるフォールディングプローブを用いた新生鎖膜透過動態解析 (ポスター)、第41回分子生物学会年会(横浜)、2018

II-1 衣斐義一・阪口雅郎 : ファミリーCに属するABCトランスポーターの異なる分子種を細胞膜の異なる領域に極性局在化させるシグナル配列 (ポスター)、第91回日本生化学会大会(京都)、2018

II-2 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 (ポスター)、第41回日本分子生物学会年会(横浜)、2018

大学院生命理学研究科

准研究員

菅 公秀

高原教代

博士前期課程

小坂優里菜

中川知香

森川真衣

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 兵庫県立大学特別研究助成金（平成 30 年度）先導研究 A

研究課題 上皮細胞において異物排出ポンプ ABCCC2 を頂端部細胞膜に極性局在化させる機構の解明

研究代表者：衣斐 義一