

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・藤田英伸・衣斐義一
Sakaguchi, M., Fujita, H., 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ン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を進めてきた。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、相補解析を含めた、各遺伝子産物の作用解析を進めた。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を見出し、リボソーム結合性多機能シャペロン関連タンパク質因子 Zuo1p による標的化抑制作用が新たに見いだされた。また、小胞体内腔 Hsp70 である Kar2p の存在量によって疎水性セグメントのトランスロコンにおける膜透過動きが向上すること、Kar2p の点変異体の発現によって、強いドミナントネガティブ作用があることを見出した。さらに、Kar2p の、ATP 結合、リン酸加水分解、基質結合領域、J-タンパク質結合領域、ドメイン間ヒンジ領域など、各機能ドメインの点変異を構築した。小胞体内腔の分子シャペロンネットワーク系のトランスロコン機能への影響を p 詳細に解析している。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許容することを見出してきた。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提唱した。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することで因子は N-末端ミリスチル化酵素であることを確定した。ミリスチル化酵素の、基質結合部位、ミリスチル CoA 結合部位、転移反応活性中心のそれぞれに必須と考えられるアミノ酸の点変異体の作成を進め、活性確認を行っている。

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.

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。ビリルビンを例にとると、ビリルビンの蓄積によって黄疸を引き起こし、重症例では神経核などが障害される。血中のビリルビンは、肝細胞の類洞側細胞膜にある輸送体（OATP1B1 および OATP1B3）によって取り込まれ、小胞体にある UDP-グルクロン酸転移酵素によってグルクロン酸抱合され、肝細胞の胆管側細胞膜にある輸送体（ABCC2）によって排出される。これらのタンパク質の機能や局在化を正常に保つことによって、ビリルビンの体内濃度が低く保たれている。

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 と OATP1B1 および OATP1B3 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。

① ABCC2 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、酵母ツーハイブリッド法により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。

③ 17 回膜貫通型の ABCC2 と同じファミリー C に分類される ABCC4 や 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。上皮細胞の頂端側の細胞膜に局在化する 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。

④ OATP1B1 および OATP1B3 の極性局在化を決定する仕組みを解明する研究が進行中である。

大学院生命理学研究科

博士後期課程

Md Shajedul Haque

博士前期課程

藤尾真子

松田頌子

大裏夏也

大原正明

城尾優実

水野花菜

科学研究費補助金等

- 1 学術研究助成基金助成金（令和2年度～令和4年度） 基盤研究C（一般）
課題番号 20K06510
研究課題 膜タンパク質の構造構築過程に関わるトランスロコン因子群の機能解明
研究代表者 阪口雅郎
- 2 （公財）武田科学振興財団（令和2年度～令和4年度）
研究課題 小胞体・ゴルジ体ストレス応答を軸とした新規創薬戦略の基盤構築
研究分担者 阪口雅郎
- 3 公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団（令和2年度教育研究助成）
研究課題 上皮細胞においてABCC2を頂端部細胞膜に局在化させる機構の解明
研究代表者 衣斐義一