

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650063

研究課題名(和文)小胞体回避モチーフ作用因子の同定への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to reveal the ER targeting suppressor

研究代表者

阪口 雅郎 (Sakaguchi, Masao)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：30205736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：疎水性の配列を持つ多くの膜タンパク質は小胞体膜へ合成と同時に組み込まれる。一方、ペルオキシソームなどのものは、小胞体標的化を回避する。今回の研究で、ペルオキシソームの主要膜タンパク質PMP70のアミノ末端に短いアミノ酸9残基のモチーフが膜タンパク質の小胞体標的化を抑制することを見出した。この作用には5番目のアミノ酸がセリンであることが必須であった。そのモチーフは分泌タンパク質の小胞体標的化も抑制した。そのモチーフに結合する因子を化学架橋で探索したところ、50kDaおよび20kDaのタンパク質が結合することを見出した。この研究で、小胞体標的化抑制作用という新奇機能を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Many membrane proteins possessing hydrophobic transmembrane segments are cotranslationally integrated into the ER membrane. Various peroxisomal and mitochondrial membrane proteins escape the ER-targeting mechanism and are targeted to their destinations. Here we discovered a short segment in the 70-kDa peroxisomal membrane protein (PMP70) that suppresses ER targeting. The first transmembrane segment has an intrinsic signal function. The ER-targeting was suppressed by a short N-terminal sequence of 9 residues that is 80 residues upstream of the transmembrane segment. Among the 9 residues, Ser5 is indispensable. The short segment also suppressed the signal peptide function of an authentic secretory protein. The 50-kDa and 20-kDa proteins were crosslinked with the motif. We propose the concept of an ER-targeting suppressor that suppresses the ER-targeting mechanism via a binding factor.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体 膜タンパク質 ペルオキシソーム シグナル配列

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内には、様々な膜オルガネラが存在している。それぞれの膜系に、特異的な膜タンパク質が局在化して独自の機能を発揮し、細胞の生命活動が維持されている。我々は、このような膜タンパク質の細胞内局在化の分子機構の解明を目指している。本研究では、典型的な多数回膜貫通タンパク質である、ATP 結合カセットを有する輸送タンパク質 (ABC 輸送体) の「細胞内配送機構」に焦点をあてた。ABC 輸送体は、単一生物種に多くの類似タンパク質が存在する、いわゆる遺伝子ファミリーを構成する。これらが、それぞれ特定の細胞内オルガネラに配置され、独自の機能を発揮する。たとえば、B 郡アイソフォームはミトコンドリア、D 郡はペルオキシソーム、C1 は細胞膜側基底部分、C2 は細胞膜頂端部分に局在化する。これらの ABC 輸送体は、それぞれの部位で、様々な物質輸送に必須の役割を担い、細胞や臓器の老廃物排出、必要な物質の搬入、などを担う。また、がん細胞においては、抗がん剤を排出することによって、がん細胞の抗がん剤耐性の原因になる。このようなことから、基礎研究にとどまらず、医学・薬学・農学の多方面で活発に研究されている。

2. 研究の目的

本研究課題では、ABC 輸送体ファミリーのなかで、ペルオキシソームに局在する ABC 輸送体 (ABCD3 アイソフォーム) に焦点をあて、特異的局在化機構を明らかにすることを目的とした。ABC 輸送体ファミリーに着目することで、互いに配列が類似するにもかかわらず局在部位が異なる分子同士を比較対照しながら研究を進めることができ、有意な情報を得ることができる。具体的目標としては、高い疎水性を持つ ABC 輸送体が小胞体への移行標的化を免れる分子基盤の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、細胞質のリボソームで合成される ABC 輸送体 D3 アイソフォームをペルオキシソームへ正確に送り込むために必要な小胞体回避機構に焦点をあてる。これまでに、ミトコンドリア内膜に存在しヘム輸送などにかかわる ABC 輸送体、ABCB10 アイソフォームの局在化機構を解析し、アミノ末端 140 アミノ酸残基の配列にトコンドリア局在化に必要な配列 (mitochondria targeting sequence, MTS) が存在すること、その MTS が無い場合には後方の疎水性配列によって小胞体に移行すること、MTS は小胞体移行を抑制する特異な機能を持っていることなどを明らかにし、「膜タンパク質の小胞体回避配列」という概念を提案し、証明してきた。これらの研究基盤を発展させ、ペルオキシソーム膜タンパク質の ABCD3 の局在化と小胞体標的化回避との関連を明らかにする。

研究対象とする ABCD3 アイソフォームは、ペルオキシソーム膜に局在化し、代謝物の輸送に重要な役割を担う。これまでの研究で、D3 アイソフォームのアミノ末端部が膜タンパク質の小胞体標的化を抑制することが判明しつつある。本研究では、具体的に次の 3 点を計画した。小胞体回避作用に必要な十分なアミノ酸配列 (モチーフ) の特定、小胞体回避モチーフの作用機序の生化学解析、小胞体回避モチーフ結合タンパク質の同定である。

(1) 必要十分な配列の確定: シグナル配列に対する小胞体回避モチーフの作用を定量的に評価するために、無細胞タンパク質合成・膜透過実験系を使用した。小胞体標的化シグナルを有するポリペプチド鎖の上流アミノ末端側に評価すべき配列を導入し、粗面小胞体膜を含む無細胞系で合成し、小胞体膜への組み込み程度を小胞体によるアスパラギン結合糖鎖の付加によって評価した。付加した配列に小胞体回避効果がある場合には、糖鎖付加が抑制される。抑制度合いを定量化することで小胞体回避活性を表現できる。この系で、様々な欠損体、アミノ酸置換体を合成し、機能の評価した。無細胞タンパク質合成実験には、ウサギ網状赤血球溶血液を使用し、粗面小胞体は、イヌ臍臓より高度に精製したものを使用した。

(2) 小胞体回避モチーフの機能の生化学解析: モチーフ競合阻害実験に、合成ペプチドまたは GST 融合タンパク質を用いた。融合タンパク質は DNA 操作技術を用いて、融合タンパク質 DNA を作成し、大腸菌高度発現システムを用いて発現し、グルタチオン樹脂を用いた親和性カラムによって精製した。これらを、無細胞実験系に添加し、小胞体標的化への効果を定量的に調べた。モチーフに結合する因子が関わる場合には、これらの添加によって、小胞体移行率が上昇することが期待された。

(3) 小胞体回避モチーフ結合タンパク質の同定: 小胞体回避モチーフに結合する因子を探索するために、化学架橋反応および親和性精製手法を考慮した。前述のモチーフ配列と GST との融合タンパク質を樹脂に固定化したカラムを作成し、細胞からの抽出液をカラムにかけることによって、結合するタンパク質の単離を試みた。また、無細胞系では、合成途上のポリペプチド鎖がリボソームに結合したままの状態を作出することができる。これを用いて、合成途上に起きる小胞体移行の阻止が細胞内に近い状態で再現できる。その状態で、化学架橋剤を適応し、結合する因子の情報取得を試みた。無細胞合成されるものは、ラジオアイソトープ標識されているために、架橋産物が分子量の大きな産物として明確に検出できることが期待された。また、新奇な方法として、ビオチン化酵素 (BioID) 法を考慮した。タンパク質にビオチンを付加する酵素の変異体で、近接するタンパク質に非特異的にビオチン化反応を起こす。BioID に小胞体回避モチーフを融合し、培養細胞内

で発現させることによって、モチーフに親和性のあるタンパク質が優先的にピオチン化される。ピオチン標識後は、ピオチンに結合するストレプトアビジンカラムによる親和性クロマトグラフィーによって候補タンパク質を精製する。

4. 研究成果

(1)必要配列の確定：ABCD3 (D3 と略す) の小胞体標的化を無細胞実験系で詳細に調べた。D3 分子の第一膜結合部分を含む部分およびその配列変異体の小胞体標的化を調べた。この実験系では、小胞体に標的化され膜の中に入った場合には、タンパク質鎖に糖鎖が付加され、電気泳動で明確に判別できる。その結果、D3 のアミノ末端 12 残基内に小胞体標的化を抑制する作用があることを突き止めた。さらに、系統的欠損実験の結果、N 末端 12 残基以内にその活性が限定された。それを、小胞体標的化抑制モチーフと命名し「N12」と略称することとした。さらに各アミノ酸残基をアラニン(Ala)に変換して変異効果を見る、アラニンスクニング実験を実行した結果、特に 5 番目のセリンと 6 番目のリシン残基の重要なことが判明した。5 番目のセリン残基を 19 種のアミノ酸残基に変えて作用を無細胞系で調べたところ、それ以外の残基では作用が認められなかった。この 5 番目には Ser でなければならないことが判明し、明確な配列要求性があると結論した。この N12 を ABCD3 に関連のない、分泌タンパク質の N-末端に付加したところ、無細胞系でも、培養細胞内でも小胞体標的化シグナル配列の作用を抑制した。

これらの事実より、ABCD3 のアミノ末端にあるこの 12 残基の配列は、厳密なアミノ酸配列を要求する配列特異性を有し、一般的な小胞体標的化機能を抑制することができる判断した。そこでこれを、“小胞体標的化抑制モチーフ (N12)” と命名した。

(2)作動性結合タンパク質が寄与することを証明：N12 の作用機構として、その配列自体が後続のシグナル配列の作用を抑圧する可能性と、その配列に作用するタンパク質因子が存在する可能性が考えられた。これらを区別するために、次のような拮抗阻害実験を行った。N12 配列およびその配列の重要な 5 番目の Ser を Ala に変換した合成ペプチドを作成し、無細胞実験系に導入したところ、N12 配列のペプチドを添加した場合に、N12 の作用が阻害され小胞体への標的化が見られた。同様な実験を N12 を N-末端に付加した GST タンパク質を大腸菌で発現させ、精製したものでも行った。この場合も、N12-融合 GST ではその添加量に応じて N12-をもつタンパク質の小胞体標的化が見られるようになった。この結果は N12 に何らかの作用因子が結合し、N12-GST の添加でその因子が不足するために N12 の効果が阻害されると結論された。

(3)N12 配列作用性因子の検出系を確立：N12

配列の結合する因子の検出に考えられる様々なアプローチを試みた。すなわち、N12-GST 融合タンパク質を用いた親和性クロマトグラフィー、N12-配列と相互作用する因子を遺伝学的に選択する酵母ツーハイブリッドスクリーニング、N12-と相互作用するものを細胞内でピオチン化して検出しようとする BioID システム、などであった。しかし、いずれの戦略でも有意な結合因子の検出には至らなかった。

最後の検出候補として、化学架橋反応による検出を試みた。N12-シグナルペプチド融合タンパク質を無細胞合成し、システインの SH-基と反応する反応基を 2 つ有する化学架橋試薬で処理したところ弱いながらも特異的な架橋産物が検出された。その反応効率を高める試みを行い、無細胞合成産物をショ糖密度勾配遠心によって部分精製した後架橋反応を行うと明確な産物が検出されることを見出した。この架橋産物は、N12 の Ser を Ala に変換したものでは認められないことから、確かに配列を識別しているものであることがわかった。

現在この化学架橋反応を指標にして、結合タンパク質のクロマトグラフィーによる精製を行っており、候補タンパク質が絞られ、電気泳動で分離し、質量分析によって同定を試みているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- (1) Kida, Y., Ishihara, Y., Fujita, H., Onishi, Y. and Sakaguchi, M. (2016) Stability and flexibility of marginally hydrophobic segments stalling at the endoplasmic reticulum translocon *Mol. Biol. Cell*, 27, 930-940 (DOI: 10.1091/mbc.E15-09-0672)
- (2) Sakaue, H., Iwashita, S., Yamashita, Y., Kida, Y., Sakaguchi, M. (2016) The N-terminal motif of PMP70 suppresses cotranslational targeting to the endoplasmic reticulum *J. Biochem.*, 159, 539-551 (DOI: 10.1093/jb/mvv132)
- (3) Kang, K., Takahara, M., Sakaue, H., Sakaguchi, M. (2016) Capsid protease domain as a tool for assessing protein-domain folding during organelle import of nascent polypeptides in living cells *J. Biochem.*, 159, 497-508 (DOI: 10.1093/jb/mvv129)
- (4) Yamagishi, M., Onishi, Y., Yoshimura, S., Fujita, H., Imai, K., Kida, Y., and Sakaguchi, M. (2014) A few positively charged residues slow movement of a polypeptide chain across the endoplasmic reticulum membrane

以上すべて査読あり

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 阪上春花, 斎藤一伸, 木田祐一郎, 岡田雅人, 阪口雅郎
合成途上の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解析(第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会・ポスター: 2015年12月1日-4日、神戸国際会議場等(神戸))
- (2) 衣斐義一, 阪口雅郎
ABCC7/CFTRのapical側細胞膜への標的化シグナルの探索(第67回日本細胞生物学会大会・口頭発表・ポスター: 2015年6月29日-7月2日、タワーホール船堀(東京))
- (3) 阪上春花, 木田祐一郎, 阪口雅郎
合成途上の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精製(第67回日本細胞生物学会大会・口頭発表・ポスター: 2015年6月29日-7月2日、タワーホール船堀(東京))
- (4) 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(第66回日本細胞生物学会大会・ポスター: 2014年6月13日、奈良県新公会堂(奈良市春日野町))
- (5) 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(第66回日本細胞生物学会大会・ポスター: 2014年6月13日、奈良県新公会堂(奈良市春日野町))
- (6) 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(第14回日本蛋白質科学会年会・ポスター: 2014年6月26日、ワークピア横浜(横浜市中区))
- (7) 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(第87回日本生化学会大会・ポスター: 2014年10月18日、国立京都国際会館(京都市左京区))

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biochem1/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 雅郎 (MASAO SAKAGUCHI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号: 30205736