

令和元年6月3日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04766

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Mechanistic characterization of translocon as a folding machinery for membrane proteins

研究代表者

阪口 雅郎 (Sakaguchi, Masao)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：30205736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質は細胞の生命機能に欠かせない多くの役割を持つ。それらの立体構造形成にかかわる小胞体トランスロコンの新規機能を解析した。トランスロコンチャンネルには中度疎水性配列を受容する新規機能部位が存在することを示した。系統的化学架橋によりその作用部位を特定した。新規開発のプローブを駆使して、膜透過に関連する新規遺伝子を見出した。これらは、トランスロコンの機能に質的な影響のある興味深いものであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内在性膜タンパク質は細胞の生命維持に必須であり、その構造形成過程の理解は生命活動の理解や、医学薬学農学領域の応用分野の基盤として重要である。この過程は、タンパク質の構造形成にはその配列特性のみで十分であるとするアンフィンゼンドグマに反し、構造規定因子が決定的に重要であることを示した。本研究で解明された新規知見は、膜タンパク質構造形成の新しい側面を解明すると同時に、新規機能性膜タンパク質のデザインや、疾病の新規病因解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Membrane proteins have many essential roles in cells. We analyzed the novel functions of endoplasmic reticulum translocon involved in their three-dimensional structure formation. The translocon channel has been shown to have a novel functional site that accepts moderate hydrophobic sequences. The site of action was identified by systematic chemical crosslinking. By exploiting newly developed probes, we have found novel genes related to membrane translocation and integration of proteins. These genes possess various qualitative effects on the translocon action.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：膜タンパク質 細胞小器官

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞内には、

内在性膜タンパク質は、細胞の生命機能に必須の多種多様な役割を果たしている。それらの大半は小胞体膜結合型のリボソームで合成され、合成と同時に膜内へ組み込まれる。その過程で、トランスロコンと呼ばれるタンパク質膜透過装置が必須の役割を果たす。トランスロコンは、リボソームから伸長するポリペプチド鎖をスキャンし、膜内配向や配置を決定する。膜組み込みにおける、トランスロコンによるポリペプチド鎖識別の実態、ポリペプチド鎖の動態(トランスロコンによるハンドリングと呼ぶ)を知ることが、膜タンパク質フォールディングの真の理解につながる。我々は、これまで小胞体トランスロコンでの膜タンパク質の膜組み込み機構に取り組み、従来のドグマでは考えられないトランスロコンの特性を明らかにしつつある。それら独自の研究展開を基盤として、膜タンパク質の構造形成過程の全容解明を目指した。

### 2. 研究の目的

(1)トランスロコンによる膜タンパク質新生ポリペプチド鎖のハンドリングの解析：我々は、トランスロコンでの、単純な膜通過以外の、多様な動態を明らかにしてきた。正電荷アミノ酸残基がトランスロコンでの通過を停止させること、正電荷によってポリペプチド鎖の逆方向への動きが誘起されることなどである。また、トランスロコンでのポリペプチド鎖の動きを秒単位の時間スケールで追跡可能な実験系を開発し、数個の正電荷アミノ酸残基が透過減速作用を示すことを実証した。さらに、中度疎水性配列がトランスロコンに動ける状態で保持されることや、その状態がリボソームによって制御されることを発見してきた。一方、複数回膜貫通形成では、親水性配列は孔を占有し次の組み込みを許さないものの、中度疎水性配列はトランスロコンの「透過孔とは異なる第2サイト」に受容され、次の膜貫通配列が組み込み可能となることを明らかにした。そこで本研究では、小胞体トランスロコンの新生鎖ハンドリング機能の実態を明らかにするために、膜組み込み停止、逆動、組み込み再開の動態を規定する要因を明らかにし、トランスロコンの「第2収容部位」を特定することを目的にした。

(2)新奇プローブ(CP-EGFP)を用いたトランスロコン孔制御関連因子の網羅的解析：生細胞内での膜タンパク質のハンドリングに伴う一時停止や、リボソームによる制御、トランスロコンの機能制御因子の解明のため、リボソームから出るとすぐにフォールディングして、後方のペプチド結合を自己切断する Semliki Forest virus のカプシドプロテアーゼドメイン(CPと略)を応用して、タンパク質の膜透過や組み込み状態を系統的に解析できる実験系を開発した。CPはリボソームから外に出るとすぐフォールドし、後方に糖鎖付加型EGFPを切断離脱させる。細胞質でのCPのフォールドを定量することで、トランスロコン以前の滞留を感知できる。この実験系によって、「因子の変異によるトランスロコンの質的变化を」を検知できるようになった。そこで本研究では、トランスロコンの正電荷配列の輸送能力、疎水性配列の受容認識など、トランスロコンの質的制御にかかわる因子の解明をめざし、新奇プローブCP-EGFPを用いて、関連因子の網羅的探索を行った。出芽酵母全遺伝子のなかでリストアップした関連遺伝子欠損の影響を系統的に調べた。

(3)新奇概念「リボソームによるトランスロコン制御」を展開：トランスロコン研究の新展開として、リボソームによるトランスロコンの機能制御があること、トランスロコンにおける中度疎水性配列の動きが、リボソームによって変動すること、リボソームトンネル内の配列変化によって、トランスロコン内の膜貫通配列の動き状況が変化することなどの知見から、リボソームは単にポリペプチド鎖を作りトランスロコンへ押し込むだけでなく、リボソームがトランスロコンを積極的に制御するという概念を提案した。そこで、その制御の実像を詳細に解析した。

### 3. 研究の方法

(1)トランスロコンによる膜タンパク質ポリペプチド鎖のハンドリング解析：膜タンパク質の構造形成に必須である「複数のセグメントの連続的な膜組み込み」を対象とした。すなわち、トランスロコンにおける、停止の動態、停止の後の後続の膜貫通セグメントの進入開始の動態を調べた。具体的には、トランスロコンでの動きが正電荷で停止すると、親水性セグメントがトランスロコン孔を占有し、後続の組み込み開始が起きない。一方、中度疎水性配列では脂質層に移行できないにもかかわらず、第2サイトに一時収容されて、後続の組み込みが可能になる。このトランスロコンの第2サイトに収容され得るポリペプチド鎖配列を特定するために、系統的にデザインした一群の配列を導入したモデルポリペプチド鎖を構築し、イヌ粗面小胞体を添加した無細胞タンパク質合成系で発現・膜組み込みさせて、膜との相互作用の有無やその程度を詳細に解析した。膜への保持と膜透過は、小胞体内腔でおきる糖鎖付加の有無で定量化した。膜との相互作用具合は、SH基とマレイミド試薬との反応性で定量解析した。

(2)トランスロコンの「第2受容サイト」の特定：上記第2サイトの分子の実体を追求するために以下の解析を行った。第2サイトがSec61チャンネル自体に存在する可能性と、トランスロコン関連補助因子がコアチャンネルに付加して構成される可能性が考えられた。補助因子の可能性は関連遺伝子網羅的解析で追求した。サイト特定のために、部位特異的的化学架橋反応を網羅的に実施した。Cys-残基を持たないSec61を構築し、それに、広範囲にわたり網羅的にCysを導入した。それぞれのSec61変異分子を安定的に発現する培養細胞HEK293株を樹立し、大量

培養し、粗面ミクロソーム小胞を単離した。また、第2サイトが収容する中度疎水性配列を有するモデルポリペプチド鎖の任意の場所に Cys 残基を導入した。一連の粗面ミクロソーム小胞を無細胞合成系に供し、Cys を含む中程度疎水性モデルポリペプチド鎖との化学架橋反応を実施した。

(3)新奇アッセイ系によるトランスロコン機能制御因子の探索：トランスロコンの質的变化、疎水性や正電荷の認識などを生細胞で簡便かつ定量的に機能評価できるツール（CP-EGFP プロープ）を開発した。この CP-ドメインは、リボソームで合成されトンネルから外に出るとすぐにフォールディングし直後のペプチド結合を切断する。自己切断は、合成途上で起き、続いて合成される後続の EGFP-ドメインの安定性は導入するモデル配列に影響されない。トランスロコン機能が低下し、透過が抑制された場合には CP-ドメインが細胞質で活性を發揮し EGFP は細胞質に検出される。トランスロコンの作用とリボソームとの強い共役があれば、CP-ドメインは内腔に透過した後でフォールディングし、EGFP は糖鎖付加型で検出される。切断された後の EGFP ドメインは可溶性であり、前方に接続した様々なモデル配列の分解などに影響されことなく、ウエスタンブロッティングによって容易に検出できる。このプロープの透過状況に対する、酵母細胞遺伝変異の影響を網羅的に追求した。

(4)「リボソームによるトランスロコン機能制御」の解析：リボソームがトンネル内のポリペプチド鎖を感知し、それに応じてトランスロコン機能を制御することが明らかとなり、リボソームとトランスロコンが協調して膜タンパク質の膜組み込みが進行すると描像が現実のものとなって来た。その機構を追求するために、無細胞系にてモデル配列の効果を検証した。第2サイトに認識される程度の中度疎水性配列の動きを、リボソーム・新生鎖複合体の条件で解析し、リボソームの PTC 近傍にある配列の動きに対する効果を解析した。

#### 4. 研究成果

(1)リボソームから伸長する新生ポリペプチド鎖の、トランスロコンによる取扱い様式、配列の認識、トランスロコンの識別部位を明らかにすることを目的とした研究を実施し下記の成果を得ている。中程度の疎水性を持つ新生鎖でも、化学架橋可能な程度トランスロコンに保持されること、その際には後続の疎水性配列のトランスロコンへの進入を妨げない状況にあることを見出した。一方、正電荷によって強制的にトランスロコンで停止させた親水性配列では、後続の疎水性配列の進入が許容されない。中程度の疎水性配列はトランスロコンの第2の機能部位に存在し後続のセグメントの膜組み込み開始を許容できると結論された。この新規機能部位を同定するために、部位特異的架橋実験を継続した。トランスロコン構成タンパク質 Sec61 分子の任意の部位に単一の Cys 残基を導入し、それを定常発現する HEK293 細胞を樹立し、一連の Cys 部位をスキャンした Sec61 を発現する細胞株群を作成し、粗面小胞体の作成を完了した。これらの細胞から小胞体膜小胞を調製し、特異的な部位に Cys を導入した新生鎖について化学架橋反応を実行し、配列の疎水性度と化学架橋する Sec61 の部位との関連を明らかにできた。

(2)新規フォールディングプロープを用いた膜透過因子群の解析では、本プロープを駆使して、トランスロコンに関連すると予想された 70 遺伝子について破壊株を入手し、合成共役型小胞体標的化に影響のある遺伝子、新生鎖上の疎水性配列の認識が大きく変動する遺伝子、新生鎖上の正電荷配列の透過に影響する遺伝子を見出すことに成功した。

(4)リボソーム内でトランスロコン機能に影響する新生鎖配列を系統的に解析し、トランスロコン機能の制御に重要な影響のあるアミノ酸残基を見出しつつある。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- (1) Kida, Y., Sakaguchi, M. (2018)  
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)
- (2) 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)
- (3) 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)
- (4) 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

以上すべて査読あり

〔学会発表〕(計 25 件)

阪口雅郎、Two independent modes of recognition of hydrophobic segment at the endoplasmic reticulum translocon (第 18 回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ、2018)

藤田英伸、Dynamic motion of nascent chain through the ER translocon with back and forth movement (国際シンポジウム Proteins: From the Cradle to the Grave, 2018)

衣斐 義一、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 (第 91 回日本生化学会大会、ポスター、2018)

藤田英伸、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(第 91 回日本生化学会大会、ポスター、2018)

菅公秀、小胞体膜透過因子 Sec71p/Sec72p の作用機序の解明 (第 91 回日本生化学会大会、ポスター、2018)

中川知香、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 (第 91 回日本生化学会大会、ポスター、2018)

森川真衣、膜タンパク質小胞体標的化抑制 (ETS) 因子としてのミリスチル転移酵素 NMT1 (第 91 回日本生化学会大会、ポスター、2018)

小坂優里菜、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 (第 91 回日本生化学会大会、ポスター、2018)

衣斐義一、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 (第 41 回分子生物学会年会、ポスター、2018 年)

菅公秀、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 (第 41 回分子生物学会年会、ポスター、2018 年)

阪口雅郎、The N-terminal motif of peroxisomal membrane protein PMP70 is ER-targeting suppressor (ETS) (第 17 回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ、2017)

木田祐一郎、小胞体トランスロコン配列認識部位の特定に向けて (第 17 回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ、2017)

菅公秀、新規フォールディングプローブを用いた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 (第 69 回細胞生物学会大会・口頭発表、2017)

衣斐義一、A clathrin accessory protein NECAP1 relocates internalized ABCC2 to the apical plasma membrane in HepG2 cells. (第 69 回日本細胞生物学会大会・ポスター: 2016 年 6 月 13 日-15 日、仙台国際センター(仙台))

阪口雅郎、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 (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表、2017)

十倉麻友子、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 (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表、2017)

衣斐義一、ABCC7/CFTR を細胞膜の apical 側へ標的化させるシグナルの探索 (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表、2017)

木田祐一郎、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のマッピング (第 90 回日本生化学会大会・口頭発表、2017)

Haruka Sakaue, The N-terminal motif of PMP70 suppresses cotranslational targeting to the endoplasmic reticulum (Nascent Chain Biology Meeting 2016, Invited Talk)

Yuichiro Kida, Recognition of nascent chain at the endoplasmic reticulum translocon is affected by the ribosome (Nascent Chain Biology Meeting 2016, Poster, 2016)

衣斐義一、Identification of cis-acting signals required for the apical targeting of ABCC7 (第 89 回日本生化学会大会・ポスター、2016)

木田祐一郎、小胞体トランスロコンでの新生鎖認識へのリボソームの関与について (第 89 回日本生化学会大会・口頭発表、2016)

菅 公秀、出芽酵母におけるシグナルペプチド作用および膜透過様式と SEC71/72 との関連 (第 68 回日本細胞生物学会大会・ポスター、2016)

十倉麻友子、出芽酵母小胞体トランスロコンへの標的化様式のシグナル配列による変化について (第 68 回日本細胞生物学会大会・ポスター、2016)

木田祐一郎、小胞体トランスロコンによる“低”疎水性配列の膜内保持機構 (第 16 回日本蛋白質科学会年会・ポスター、2016)

〔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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。