

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：24506

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19058013

研究課題名（和文） 膜タンパク質のオルガネラ膜標的化と構造形成システム

研究課題名（英文） Organelle targeting and integration system for membrane proteins

研究代表者 阪口 雅郎 (SAKAGUCHI MASAO)

(兵庫県立大学・大学院生命理学研究科 教授)

研究者番号：30205736

研究成果の概要（和文）：細胞膜の中に存在する膜タンパク質が合成され、正しくオルガネラに移行し、形が出来上がるまでの過程を研究した。タンパク質が膜を通り抜ける引き金となるシグナル配列が、タンパク質を引き込む力をも発揮すること、プラス電荷を持っているアミノ酸はタンパク質鎖の膜透過を抑制して、膜を貫く構造を形成するのを助けることなどを明らかにした。また、膜タンパク質が、小胞体以外のオルガネラ膜に行くのを決定するアミノ酸配列があることを発見した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we found the follows. The signal sequence, which triggers translocation of polypeptide chain, provides the motive force for polypeptide chain translocation. Positive charges of polypeptide chain cause stop-translocation in the membrane. A certain signal sequences suppress the targeting of hydrophobic segment to endoplasmic reticulum and mediate correct sorting to the cell organelle other than endoplasmic reticulum.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,600,000	0	14,600,000
2008年度	14,600,000	0	14,600,000
2009年度	14,600,000	0	14,600,000
2010年度	14,600,000	0	14,600,000
2011年度	14,600,000	0	14,600,000
総計	73,000,000	0	73,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：膜タンパク質、シグナル配列、トポロジー、生体膜、オルガネラ

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、内部に存在する様々なオルガネラに正しく局在化する機構が欠かせない。細胞内オルガネラへの移行シグナルがほぼ解明され、局在化関連因子のリストアップが進められて来た。しかし、それぞれのシグナル配列とそれぞれの因子との間の識別機構

や、タンパク質が膜に進入するときのダイナミクスなどに関する研究はいまだ乏しい。本研究ではこれらに正面から取り組んだ。また、膜タンパク質は疎水性膜貫通セグメントをもつが、これらはシグナル認識粒子 (SRP) による小胞体への標的化機構に識別される。しかし、小胞体系以外のオルガネラにも多く

の膜タンパク質が存在する。小胞体関連しないこれらの膜タンパク質は小胞体標的化を回避する。本研究ではこの分子機構を探索した。

## 2. 研究の目的

### (1) 小胞体でのトランスロコンを介したフォールディングダイナミクス

真核細胞の70%を超える膜タンパク質は小胞体で膜に組み込まれ立体構造を形成する。ここでは、ポリペプチド鎖が正しい配向で膜に組み込まれ、的確に立体構造を形成し、時には疎水性度のきわめて低い膜貫通セグメントが形成される。この過程には、トランスロコンという膜タンパク質膜組み込み装置が必須である。

本研究では、リボソームと小胞体トランスロコンが関与する、ポリペプチド鎖の膜組み込みとフォールディング過程の解明を目指した。これまでの研究で、小胞体のトランスロコンチャンネルを通じた膜透過を任意に停止・再開できる無細胞実験系を確立している。たとえば、ストレプトアビジン結合タグ(SBP-tag)をN-末端に付加することによってストレプトアビジン(SAv)透過を抑制し、ビオチンを添加することで同期した膜透過を再開できる。これらの系で、小胞体トランスロコン孔での透過駆動力、トポロジー形成制御配列の作用機構、膜組み込みの時期、膜貫通セグメント間のフォールディングのダイナミクスを明らかにすることを目的とした。

### (2) 膜タンパク質の小胞体回避機構

大半の内在性膜タンパク質は膜を貫通する $\alpha$ -ヘリックスを持つ。疎水性配列は小胞体への標的化シグナルとなり、SRP経路によって小胞体へと合成途上に運ばれることとなる。しかし、ミトコンドリアやペルオキシソームの膜タンパク質はこの機構を回避し、合成後のオルガネラ標的化機構により仕分けられる。ここでは、疎水性度の高い膜タンパク質が小胞体を回避する機構を明らかにする。すでにミトコンドリアABC輸送体で膜タンパク質に特化したミトコンドリア標的化シグナルを明らかにしており、このシグナルによる小胞体回避がSRP-トランスロコン経路のどの段階で起きているかを生化学解析で明らかにする。また、ペルオキシソームABC輸送体分子内に存在するオルガネラ局在シグナルと、小胞体回避シグナルをそれぞれ明らかにし、それぞれの作用機序を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 小胞体でのトランスロコンを介したフォールディングのダイナミクス

#### ①膜透過中間状態の解析

N-末端側を膜透過させるシグナル配列(SA-I配列)のN-末端側にSBPを付加すると、SAvによって膜透過を停止させた後、ビオチンでSAvを解離させ任意に膜透過を再開できる。これらの実験系を用いて、ポリペプチド鎖の膜透過を同調的に解析し、膜透過の「駆動力」、ポリペプチド鎖にかかる駆動力の変動、エネルギー供給源、リボソームの要求段階、を明らかにする。

#### ②シグナル配列のトランスロコン内での相互干渉および膜環境への離脱

制御可能なN-末端ドメインの膜透過解析系を応用して複数の膜貫通部分のある膜タンパク質のフォールディングを解析する。トランスロコンによる段階的な膜貫通セグメントのアセンブリと脂質層への放出を素過程に分解して解析し、トランスロコンのダイナミクスに関する知見を得る。膜内配置の探索には化学架橋・光架橋反応を用いる。

### (2) 膜タンパク質の小胞体回避機構

ABC輸送体は多数のアイソフォームから校正されるファミリーであり、異なるオルガネラの異なるアイソフォームが局在する。ABCB10(ミトコンドリア)、ABCD3(ペルオキシソーム)、ABCA1(分泌経路)のそれぞれ局在性の異なるアイソフォームを素材に、それぞれを互いに対照として、無細胞タンパク質合成・小胞体膜・ミトコンドリア膜を含む実験系を用いて小胞体標的化回避を解析する。

#### ①小胞体標的化抑制の生化学解析

ミトコンドリア局在ABCB10とペルオキシソーム局在ABCD3を用いる。これらが小胞体標的化を回避する段階を明らかにする。SRPとの相互作用を化学架橋反応とSRP抗体による免疫沈降で、トランスロコンへの標的化を膜結合とSec61 $\alpha$ サブユニットとの架橋反応で、未知因子との相互作用を架橋後の電気泳動パターンで調べる。架橋反応する未知因子はプロテオミクスの手法を用いて明らかにする。

#### ②小胞体回避情報の特定

小胞体標的化回避のために必要な「オルガネラ標的化情報と情報識別因子の作用」を調べる。ABCD3ではPex19とSRPとの相互関係を

解析する。ミトコンドリア ABCB10 では類似した因子は未知であるため、B10 の有する膜タンパク質に特化したミトコンドリア標的化プレ配列 (N110) に結合する因子の探索を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 小胞体トランスロコンでの疎水性膜貫通配列の予想外のダイナミクスを発見

新生ポリペプチド鎖の生成に共役した膜透過を詳細に解析し、疎水性配列から 60 残基離れた正電荷アミノ酸が膜貫通トポロジー形成を誘導できること、そのとき疎水性配列は一度小胞体膜内腔に露出すること、最終的に疎水性配列は正電荷の作用によって膜貫通状態を形成することなどを示した。正電荷は疎水性配列から予想以上に離れた状態で膜透過を抑制できると結論した。これを発展させて、新生鎖に結合する糖鎖が膜タンパク質の膜トポロジー規定要因であることを示した。さらに、疎水性配列によらず、正電荷アミノ酸残基が新生鎖の膜透過抑制作用を有することを証明した。

(2) シグナル配列自体がポリペプチド鎖の膜透過駆動作用を実証。

SBP-tag と SAv を応用したポリペプチド鎖膜透過制御実験系を使って、ポリペプチド鎖の膜透過を抑制するのに必要な SAv 濃度を測定し、透過駆動作用を定量化した。その結果、膜透過駆動作用は  $K_d \approx 10^{-9}$  程度の親和性と拮抗すること、シグナル配列に近い部位に作用する膜透過駆動力は、離れた部位に対するものよりも大きいこと、シグナル配列の疎水性部分へのプロリン残基の導入によって膜透過駆動作用が低下することなどを明らかにした。これらを総合して、シグナル配列自体が膜透過駆動力を供給すると結論した。

(3) トランスロコンの親水性ポリペプチド鎖許容特性の解明

SBP-tag と SAv を駆使し、トランスロコンサブユニットと透過途中のポリペプチド鎖の配置関係をさらに精査した。膜透過途上の 2 本のポリペプチド鎖は親水環境内に保持されていることが明らかになった。トランスロコンは複数のポリペプチド鎖を許容できる親水環境を保持できると結論された。

(4) ペルオキシソーム膜タンパク質 PMP70 の小胞体標的化回避

アミノ末端部分には、3 種のオルガネラ標

的シグナルが混在し、それらが協調的に作動することによって、ペルオキシソームへの局在化と膜組み込みが達成されることを明らかにした。ペルオキシソーム膜タンパク質 ABC 輸送体 D3 アイソフォーム (PMP70) の小胞体膜組み込み特性および、小胞体標的化の抑制について無細胞系で解析し、最初の膜貫通セグメント (TM1) が小胞体に組み込まれる特性を有すること、その組み込みを N 末端 12 残基の短いセグメント (N12) が抑制していること、その抑制に 5 番目の Ser 残基が必須であること、N12 モチーフ-GST 融合タンパク質の精製標品が N12 による小胞体標的化抑制作用を解除することなどを見出した。厳密な配列特性を有するモチーフが、何らかの因子を介して小胞体組み込み作用を発揮していると結論した。

(5) 膜タンパク質の極性局在化制御

ABC 輸送体 C2 アイソフォームを対象とした。C2 は極性化した細胞の細胞膜頂端側に局在化し特定の物質の排出に寄与する。この極性局在化にカルボキシル末端 77 残基が関わることを明らかにした。これに結合する因子を探索し PDZK1 を同定した。さらに、PDZK1 がカルボキシル末端のモチーフに結合すること、細胞膜頂端側に存在すること、モチーフを変異すると C2 の頂端側への局在化が大きく低下することなどを見出した。また、C2 の局在化を規定する 5 アミノ酸残基のモチーフを見出した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- (1) Yamamoto, H., Fujita, H., Kida, Y. and Sakaguchi, M. (2012)  
Pleiotropic effects of membrane cholesterol on protein translocation across the ER membrane **Biochemistry**, in press (doi: 10.1021/bi2018915)
- (2) Emi, Y., Yasuda, Y. and Sakaguchi, M. (2012)  
A cis-acting five-amino acid motif controls targeting of ABCC2 to the apical plasma membrane domain **J. Cell Sci.**, in press (doi:10.1242/jcs.099549)
- (3) Fujita, H., Yamagishi, M., Kida, Y. and Sakaguchi, M. (2011)

- Positive charges on the translocating polypeptide chain arrest movement through the translocon  
**J. Cell Sci.**, 124, 4184-4193.
- (4) Yamagishi, M., Fujita, H., Morimoto, F., Kida, Y. and Sakaguchi, M. (2011)  
A sugar chain at a specific position in the nascent polypeptide chain induces forward movement during translocation through the translocon  
**J. Biochem.**, 149, 591-600.
- (5) Emi, Y., Nomura, S., Yokota, H., and Sakaguchi, M. (2011)  
ATP-binding cassette transporter isoform C2 (ABCC2) localizes to the apical plasma membrane via interactions with PDZK1 scaffolding protein  
**J. Biochem.**, 149, 177-189
- (6) Fujita, H., Kida, Y., Hagiwara, M., Morimoto, F., and Sakaguchi, M. (2010)  
Positive charges of translocating polypeptide chain retrieve an upstream marginal hydrophobic segment from ER lumen to translocon  
**Mol. Biol. Cell**, 21, 2045-2056
- (7) Kida, Y., Kume, C., Hirano, M., and Sakaguchi, M. (2010)  
Environmental transition of signal-anchor sequences during membrane insertion via the endoplasmic reticulum translocon  
**Mol. Biol. Cell**, 21, 418-429.
- (8) Iwashita, S., Tsuchida, M., Tsukuda, M., Yamashita, Y., Emi, Y., Kida, Y., Komori, M., Kashiwayama, Y., Imanaka, T. and Sakaguchi, M. (2010)  
Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70  
**J. Biochem.**, 147(4), 581-590.
- (9) Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M. (2009)  
Signal-anchor sequence provides motive force for polypeptide-chain translocation through the ER membrane  
**J. Biol. Chem.** 284, 2861-2866
- (10) Kashiwayama, Y., Seki, M., Yasui, A., Murasaki, Y., Morita, M., Yamashita, Y., Sakaguchi, M., Tanaka, Y., Imanaka, T. (2009)  
70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins  
**Exp. Cell Res.** 315, 190-205.
- (11) Kishi, M., Emi, Y., Sakaguchi, M., Ikushiro, S., and Iyanagi, T. (2008)  
Ontogenic Isoform Switching of UDP-glucuronosyltransferase Family 1 in Rat Liver  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 377, 815-819.
- (12) Tsuchida, M., Emi, Y., Kida, Y., and Sakaguchi, M. (2008)  
Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 369, 369-375.
- (13) 阪口雅郎 (2010)  
小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質の膜組み込みと構造形成  
膜 (日本膜学会会誌), 35, 63-71.
- (14) 阪口雅郎, 木田祐一郎 (2008)  
膜タンパク質の膜組み込みとトランスロコンの柔軟性  
生化学, 80, 897-906.
- (15) Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M. (2007)  
Two translocating hydrophilic segments of a nascent chain span the ER membrane during multispinning protein topogenesis  
**J. Cell Biol.** 179, 1441-1452.
- (16) Zhang, L., Sato, Y., Hessa, T., von Heijne, G., Lee, J.-K., Kodama, I., Sakaguchi, M., and Uozumi, N. (2007)  
Contribution of hydrophobic and electrostatic interactions to the membrane integration of the Shaker K<sup>+</sup>-channel voltage-sensor domain  
**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 104, 8263-8268.
- 以上全て査読有
- [学会発表] (計 45 件)
- (1) 姜公秀, 高原教代, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
TA 膜タンパク質の小胞体組み込み回避とミトコンドリア標的化機構 (第 34 回日本分子生物学会年会・ポスター, 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜)
- (2) Emi, Y. and Sakaguchi, M.  
A unique cis-acting motif in a cytoplasmic loop domain of the ATP-binding cassette transporter isoform C2(ABCC2) controls apical targeting (Poster, The 34th Annual

Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2011 Dec. 13-16, Yokohama, Japan)

- (3) 衣斐義一, 阪口雅郎  
ABCC2 の apical 側細胞膜への局在化を制御するシグナルの解析 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都)
- (4) 木田祐一郎, 藤田英伸, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンにおける疎水性配列の認識・膜組み込み機構の解析 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都)
- (5) 山本等, 藤田英伸, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンのタンパク質膜透過に対するコレステロールの多面的影響 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都)
- (6) 藤田英伸, 山岸麻里英, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
小胞体膜トランスロコンにおけるポリペプチド鎖の動き解析 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都)
- (7) 山岸麻里英, 大西由希子, 藤田英伸, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンを介した膜貫通セグメント形成に対するリボソームの作用 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都)
- (8) 阪上春花, 岩下昌平, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンへの組み込みを抑制するアミノ末端モチーフの解析 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都)
- (9) 矢吹隆明, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
複雑な膜透過中間体が示す小胞体トランスロコンのポリペプチド鎖収容特性 (第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21-24 日, 京都)
- (10) Fujita, H., Kida, Y., Yamagishi, M., and Sakaguchi, M.  
Effect of positive charges on the movement of polypeptide chain through the ER translocon (第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 16-18 日, 姫路)
- (11) Emi, Y. and Sakaguchi, M.  
Identification of a cytoplasmic signal for targeting of ABCC2 to apical plasma membrane (第 63 回日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27-29 日, 札幌)
- (12) Sakaguchi, M., Iwashita, S., Yamashita, S., Sakaue, H. and Kida, Y.  
ER-targeting Suppression by Short N-terminal Motif of Peroxisomal ABC Transporter, PMP70 (第 63 回日本細胞生物学会大会, 2011 年 6 月 27-29 日, 札幌)
- (13) 藤田英伸, 木田祐一郎, 山岸麻里英, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質構造形成への正電荷アミノ酸の寄与 (第 11 回日本蛋白質科学会年会・ポスター, 2011 年 6 月 7-9 日, 大阪)
- (14) 木田祐一郎, 藤田英伸, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンを介した膜貫通配列組み込み機構の解析 (第 11 回日本蛋白質科学会年会・ポスター, 2011 年 6 月 7-9 日, 大阪)
- (15) Sakaguchi, M.  
Dynamic action of positive charges on nascent polypeptide chain translocating through translocon. (The 3rd International Symposium on Protein Community, 2010, Sep. 13-16, Nara)
- (16) Fujita, H., Kida, Y., Yamagishi, M., Hagiwara M., Sakaguchi, M.  
Positive charges in translocating polypeptide chain regulate the movement through translocon (The 3rd International Symposium on Protein Community, poster, 2010, Sep. 13-16, Nara)
- (17) 山岸麻里英, 藤田英伸, 森本富美子, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンにおける膜貫通セグメント形成のダイナミクス (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸)
- (18) 藤田英伸, 山岸麻里英, 木田祐一郎, 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンを介したタンパク質の膜透過は正電荷によって一時停止する (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7-10 日, 神戸)
- (19) 阪口雅郎  
小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質の膜組み込みと構造形成 (日本膜学会第 32 年会・生体膜関連シンポジウム「膜と膜機能の可視化」, 5 月 14 日, 東京)
- (20) 阪口雅郎  
細胞内での膜タンパク質の形づくり (第 4 回分子科学会シンポジウム、「ミクロ～メソ～マクロを繋ぐ「形」が立ち現れる仕組み」, 7 月 10 日, 東京)
- (21) 藤田英伸, 山岸麻里英, 木田祐一郎, 阪

阪口雅郎

トランスロコンを通るポリペプチド鎖の動きは正荷電アミノ酸残基で減速する (第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月16-18日、札幌)

(22) 阪口雅郎

小胞体トランスロコンでの膜透過停止とポリペプチド鎖のダイナミクス (第82回日本生化学会大会・シンポジウム「タンパク質膜透過装置の構造とダイナミックな機能」; Structure and dynamic function of protein translocation machinery、2009年10月21-24日、神戸)

(23) 衣斐義一、野村幸子、横田博、阪口雅郎  
ABCC2とPDZK1との相互作用による微小胆管細胞への局在化制御 (第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸)

(24) 藤田英伸、山岸麻里英、木田祐一郎、阪口雅郎  
小胞体トランスロコンの膜透過は正荷電アミノ酸残基のみによって停止する (第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸)

(25) 山岸麻里英、藤田英伸、森本富美子、木田祐一郎、阪口雅郎  
小胞体でのタンパク質膜透過における部位特異的な糖鎖のラチェット作用 (第82回日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸)

(26) 阪口雅郎、木田祐一郎、森本富美子  
小胞体トランスロコンにおいて膜貫通配列が駆動するポリペプチド鎖膜透過 (第9回日本蛋白質科学会年会、2009年5月20-22日、熊本)

(27) 藤田英伸、木田祐一郎、森本富美子、阪口雅郎  
正荷電アミノ酸残基による小胞体膜透過制御 (第81回日本生化学会大会・第31回分子生物学会大会合同、2008年12月9-12日、神戸)

(28) Sakaguchi, M., Kida, Y.  
Flexibility of translocon and driving force for polypeptide chain translocation (ミニシンポジウム「タンパク質の機能発現と品質管理: サーベイランスとハンドリング」 第59回日本細胞生物学会大会、2007年5月28-30日、福岡)

(29) 木田祐一郎、森本富美子、阪口雅郎  
ポリペプチド鎖小胞体膜透過の膜貫通配列による駆動システム (第7回日蛋白質科学会大会、ポスター、2007年5月24-26日、仙台)

(30) Kida, Y., Sakaguchi, M.

Translocon accommodates two translocating hydrophilic chains and two signal sequences. (Gordon Research Conference on Protein Transport across Cell Membranes, poster, June 10-15, 2007, Lucca, Italy).

(31) Sakaguchi, M.  
Membrane protein topogenesis through ER translocon. (International Symposium on Milestones in the life of proteins, Kyoto, 2007年3月15-16日)

[図書] (計 件)

(1) 阪口雅郎 (2010)  
粗面小胞体とタンパク質合成  
**細胞の構造とオルガネラ** (生物薬科学実験講座5、大熊勝治・中西義信編集、廣川書店) 33-46.

(2) 阪口雅郎 (2010)  
小胞体膜形成機構  
**細胞の構造とオルガネラ** (生物薬科学実験講座5、大熊勝治・中西義信編集、廣川書店) 172-185.

(3) 阪口雅郎 (2008)  
シグナル仮説、シグナル認識粒子、膜蛋白質のトポロジー形成 (項目執筆)  
**キーワード: 蛋白質の一生** (蛋白質核酸酵素6月号増刊), 53.

[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

研究者番号:

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号: