

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590054
 研究課題名 (和文) ABC タンパク質 D 群のオルガネラ膜への選別輸送と機能発現の分子メカニズム
 研究課題名 (英文) Organelle selective targeting of ABC subfamily D proteins and molecular mechanisms of their functions on the membranes
 研究代表者
 今中 常雄 (IMANAKA TSUNEO)
 富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授
 研究者番号：50119559

研究成果の概要 (和文)：

ABC タンパク質 D 群 (ABCD1~4) のオルガネラ選別輸送機構を解析し、N 末端に存在する疎水性領域の有無が局在性を決めていることを明らかにした。この疎水性領域をもつ ABCD1~3 はペルオキシソーム形成因子 Pex19p と相互作用し、ペルオキシソーム膜上の Pex3p を介してペルオキシソーム膜へ輸送されることを示した。一方、この領域をもたない ABCD4 は小胞体膜へ輸送される。ABC タンパク質 D 群の機能については、ペルオキシソーム型 (ABCD1~3) が acyl-CoA の輸送に関与すること、小胞体型 (ABCD4) はヘム代謝に関与する可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：

We found that the hydrophobic properties of NH₂-terminal cytosolic region of ABC subfamily D proteins determine their subcellular localization. ABC proteins (ABCD1~3) with the NH₂-terminal hydrophobic region are targeted to peroxisomes through the interaction of ABCD1~3 to Pex19p and Pex3p. On the other hand, ABCD4 without the hydrophobic region is targeted to endoplasmic reticulum. Concerning function of ABC subfamily D proteins, ABCD1~3 are suggested to be involved in transport to acyl-CoA and ABCD4 is involved in heme metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物系

キーワード：ABC タンパク質、ペルオキシソーム、小胞体、局在化機構、基質輸送機構、脂肪酸輸送、Pex19p、Pex3p

1. 研究開始当初の背景

ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、膜結合ドメインとヌクレオチド結合ドメインをもつ一群のタンパク質で、生体膜を介した様々な物質輸送に重要な役割を担っている。ヒトでは 48 種類の ABC タンパク質が同定され A-G の 7 群に分類され

ている。哺乳動物 ABC タンパク質 D 群では、ABCD1/ALDP、ABCD2/ALDRP、ABCD3/PMP70、ABCD4/P70R の 4 種類が同定され、ペルオキシソーム膜に局在すると考えられていた。しかしながら我々は、P70R はペルオキシソームではなく小胞体に局在していることを見出した。よって、ABC タンパク質 D 群がどのような仕組みで

ペルオキシソームもしくは小胞体に選別輸送されているかは興味深い。

さて ABC タンパク質 D 群を含むペルオキシソーム膜タンパク質は、遊離型ポリソームで翻訳されて、細胞質中のペルオキシソーム形成因子 Pex19p と結合し、ペルオキシソーム膜上の Pex3p との相互作用を介してペルオキシソーム膜に挿入される。しかしながら、局在化シグナル、その受容体、トランスロコンの同定を含め、ペルオキシソーム膜への移行と挿入過程の詳細は不明である。

一方生合成された小胞体膜タンパク質は、N 末端側に存在する小胞体局在化シグナルが SRP と結合し co-translational に翻訳され、stop-transfer 配列により特有のトポロジーをもって局在化すると考えられている。しかしながら、小胞体に留まる分子機構は不明な点が多い。

機能に関しては、ABC タンパク質 D 群は、その局在性より脂肪酸代謝に関わると推測されてきた。我々は CHO 細胞に野生型、変異型 ABC1、ABCD3 を安定発現させ、ABCD3 が長鎖脂肪酸 CoA の、ABCD1 が極長鎖脂肪酸 CoA の輸送に関与する可能性を明らかにしてきた。また他のグループの解析により、ABCD1~3 は脂肪酸 β 酸化と関連し、acyl-CoA の細胞質側からペルオキシソーム内への輸送に関与していると推定されている。しかしながら、その輸送機構の詳細は不明である。P70R については何を輸送するのかも明らかにされていない。よって、ABC タンパク質 D 群の選択的局在化機構と膜上での機能の解析は重要な課題である。

2. 研究の目的

ABC タンパク質 D 群の生理的役割の全体像を明らかにすることを目的として、オルガネラ膜への選別輸送機構と各 ABC タンパク質の基質認識と輸送機構を解析した。

(1) ABC タンパク質 D 群の局在化機構

ペルオキシソーム型 ABC タンパク質は生合成後細胞質で Pex19p と複合体を形成する。その後、どのような機序でペルオキシソーム膜に局在化するのかを明らかにする。特にペルオキシソーム膜局在化シグナル、Pex19p とペルオキシソーム膜上の Pex3p との相互作用、ペルオキシソーム膜への挿入過程を明らかにする。一方、ABCD4 については小胞体局在化機構と小胞体膜 retention シグナルを明らかにする。これらの解析を踏まえ、ABC タンパク質 D 群のペルオキシソーム膜と小胞体膜への選別機構を提示する。

(2) ABC タンパク質 D 群の基質輸送の分子機構

ペルオキシソーム型の ABCD1~3 については、光親和性官能基を導入した acyl-CoA を基質として photoaffinity ラベルを行い、基質認識部位を同定する。P70R については、ヒト肝癌細胞で P70R を用いて、野生型ならびに部位特異的変異型 P70R を安定過剰発現する細胞を作製し、種々の代謝変動や遺伝子発現プロファイルの解析によって、その機能を予測する。さらに、酵母 *Pichia pastoris* 発現系により各種 ABC タンパク質 D 群を大量発現させ、活性を保持した状態での精製を試みる。

3. 研究の方法

(1) ABC タンパク質 D 群のオルガネラ膜選別輸送機構の解析

① ABC タンパク質 D 群の細胞内局在性

ABC タンパク質 D 群の細胞内局在性は、C 末端側に GFP もしくは HA タグを融合させたタンパク質を CHO 細胞に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。また ABCD1 ならびに ABCD4 については、各種の変異タンパク質を CHO 細胞に発現させ、ペルオキシソームならびに小胞体局在化シグナルについて解析した。また内在性の ABCD4 の細胞内局在性は、ラット肝臓を用い、細胞分画法後 immunoblotting により解析した。

② ABCD3 ならびに ABCD4 と Pex19p の相互作用

ヒト His-Pex19p を大腸菌に発現させ、精製した。ABCD3 ならびに ABCD4 の mRNA を調製し、精製 Pex19p、 $[^{35}\text{S}]$ Met 存在下、wheat germ cell free translation system で翻訳した。ABCD3、ABCD4 と Pex19p との結合は、抗 His 抗体を用いた免疫共沈法により解析した。

③ Pex3p と Pex19p との相互作用の解析

ヒト Pex3p の細胞質ドメイン His-Pex3p (aa. 49-373)、ヒト GST-Pex19p を大腸菌に発現させ精製した。また部位特異的変異体についても同様に精製した。Pex3p と Pex19p との相互作用は、Pex3p を glutathione-Sepharose に結合させた GST-Pex19p と incubation 後、pull-down assay により解析した。

④ Pex3p/Pex19p 複合体の 3 次元構造解析

ヒト Pex3p の細胞質ドメイン GST-Pex3p、ヒト GST-Pex19p (aa. 1-44) を大腸菌に発現させ、精製した。Pex3p と Pex19p を 1:2 で混合し、ポリエチレングルコールを沈殿化剤よして結晶化させた。Spring-8 の BL41XU および BL38B1 にて X 線解析データを収集し、2.5 Å 分解能における複合体の結晶構造を決定した。

(2) 基質輸送機構の解析

①P70R 安定発現細胞による機能解析

野性型ならびに Walker A モチーフに変異をいれた P70R cDNA をヒト肝癌細胞 HuH-7 に transfection し、それぞれの安定過剰発現細胞を作製した。脂質代謝との関連性については、取得した細胞に [¹⁴C]oleate や [¹⁴C]acetate を添加し、膜脂質への分布、リポタンパク質としての medium への分泌量を解析した。さらに control 細胞、野性型ならびに部位特異変異安定細胞より mRNA を調製し、DNA マイクロアレイを用い、遺伝子発現プロフィールを解析した。

②Photoaffinity labeling

ABCD3 の基質輸送機構を明らかにするため、基質認識部位の同定を試みた。光親和性プローブとしてジアジリンとビオチン基を導入した長鎖脂肪酸 CoA を基質として、ラット肝より精製したペルオキシソームと incubation し、光照射後、Streptavidin-horseradish peroxidase を用いて反応産物を検出した。

③ABC タンパク質 D 群の酵母 *Pichia pastoris* での発現

ヒト、線虫等 17 種類の His タグを付加した ABC タンパク質 D 群 cDNA を酵母 *Pichia pastoris* に transfection し、メタノールで発現誘導した。菌体から膜分画を調製し、発現タンパク質を 2% bDDM で可溶化し、TALONE Metal Affinity Resin で精製した。

4. 研究成果

ABC タンパク質 D 群のオルガネラ膜への選別輸送機構と基質輸送の分子機構の解析を行い、以下の成果を得た。

(1) ペルオキシソーム型 ABC タンパク質のペルオキシソームへの局在化機構

①ペルオキシソーム膜局在化シグナルの同定

N 末端ならびに C 末端より順次欠損させた ABCD3-GFP、GFP-ABCD3 を CHO 細胞に発現させ、その細胞内局在性を解析した。その結果、膜貫通ドメイン (TMD) 1-2 を含む N 末端 144 アミノ酸配列中にペルオキシソーム膜局在化シグナルが存在することが明らかになった。さらに TMD1 に隣接した N 末端側の疎水性アミノ酸ドメイン中の 2 つの疎水性アミノ酸領域をそれぞれ親水性アミノ酸に置換するとペルオキシソーム局在性が消失した。前者が Pex19p との結合、後者がペルオキシソーム膜上の受容体介した ABCD3 の膜挿入に関与する可能性が

示唆された。

②ABCD3 と Pex19p との相互作用

N 末端ならびに C 末端より順次欠損させた ABCD3 cDNA を in vitro で転写後、mRNA を精製し、His-Pex19p 存在化 in vitro で翻訳させ ABCD3 と Pex19p との結合性を解析した。その結果、N 末端領域と C 末端領域に Pex19p との結合に重要な領域が同定された。

③Pex3p と Pex19p との相互作用と 3 次元構造

Pex3p は、6 本の α ヘリックスから構成される回転楕円状の新規な構造 (twisted six-helix bundle) であることが判明した。最も長い α 2 が中心に位置し、他の 5 つの α ヘリックスが α 2 に巻き付く構造をとっていた。Pex19p ペプチドは α ヘリックス構造をとり、Pex3p の最先端部に結合していた。Pex3p は Typ-104 で区分される 2 つの疎水性の cavity をもち、分子表面に近い cavity で Pex19p の Lue-18、Leu-21、Leu-22 と結合し、分子内の cavity で Pex19p の Phe-29 と結合していた。X 線結晶解析により Pex3p と Pex19p との相互作用に重要である可能性が示唆された Pex19p の Leu-18、Leu-21、Leu-22、Phe-29 を Ala に置換した GST-Pex19p を作製し、His₁₀-Pex3p を用いた pull down assay を行った。その結果、野生型は His₁₀-Pex3p に結合したが、L18A、L21A、L22A、F29A の置換をもつ GST-Pex19p は His₁₀-Pex3p に結合しなかった。一方、Pex3p の Trp-104 を Ala に置換した His₁₀-Pex3p は、GST-Pex19p に結合しなかった。

(2) 小胞体型 ABC タンパク質の小胞体への局在化機構

①ABCD4 の小胞体局在化機構

ABCD4 はペルオキシソームではなく、小胞体に局在化することが明らかになった。そこで N 末端より順次欠損させた ABCD4-HA を CHO 細胞に発現させ、細胞内局在性を解析した。その結果、TMD1 から TMD6 までの TMD について、TMD の直前から翻訳させた ABCD4-HA は小胞体に局在したが、TMD の前に細胞質側のアミノ酸配列をもつものは小胞体に局在しなかった。よって、N 末端の疎水性 TMD が小胞体局在化と小胞体滞留に重要であることが示唆された。

②ペルオキシソームと小胞体への選択的輸送機構

ABCD1-3 と ABCD4 のホモロジーとアミノ酸配列を比較すると、ABCD4 は、ABCD1-3 がもつ TMD1 の末端側の疎水性アミノ酸を含むペルオキシソーム移行シグナルを欠いている。この領域を含む N 末端 61 アミノ酸を ABCD4-HA に融合させたタンパク質を CHO

細胞に発現させると、ミトコンドリアに局在した。そこで、ABCD3 について N 末端 81 アミノ酸から順次 TMD1-2 を含む領域まで発現させると、TMD1 の直前までのタンパク質はミトコンドリアに局在したが、TMD1 から延長するに従い、ペルオキシソームへの局在化が増加し、TMD-2 を含むと、ほぼ 100% ペルオキシソームに局在した。一方、ABCD3 を TMD1 から発現させると小胞体に局在化した。すなわち、ABCD1-3 の N 末端側の延長配列は、翻訳されたタンパク質が小胞体に局在することを回避し、かつ TMD1-2 と協調して Pex19p との結合を安定化し、ミトコンドリアではなく、ペルオキシソームへ局在化させる役割をもつことが推測された。

③種を選別輸送機構が存在する可能性

ABC タンパク D 群について、これまで同定されている全生物種のタンパク質について hydrophathy plot をとると、ペルオキシソームに局在することが明らかにされている、ヒトならびにマウス ABCD1~3、酵母 Pxa1、Pxa2、スロイヌナズナ CTS には TMD1 の N 末端側に疎水性アミノ酸配列を含む延長領域をもつことが明らかになった。一方、小胞体型を証明したのは、今回の ABCD4 が初めてである。そこで N 末端延長配列の有無が存在する線虫 ABC タンパク質 D 群 (pmp-1~5) について、C 末端に GFP を融合したタンパク質を CHO 細胞に発現し、その細胞内局在性を解析した。その結果、延長配列をもつ pmp-1, 2, 4 はペルオキシソームに局在したが、もたない pmp-3, 5 は小胞体に局在した。よって、この選別輸送は種をこえて存在する可能性が示唆された。

(3) ABC タンパク質 D 群の機能

①ABCD4 安定過剰発現細胞 HuH-7 での解析

野生型ならびに変異型 P70R 安定過剰発現 HuH-7 細胞株を用い、 $[^{14}\text{C}]$ oleate や $[^{14}\text{C}]$ acetate を添加し、脂質の合成と分泌について検討したが、有意な差はみられなかった。一方、DNA マイクロアレイにより各種代謝系遺伝子の網羅的解析を行ったところ、変異型 P70R 安定発現株において lysine 代謝系酵素群の遺伝子発現が増加していた。また、heme 合成に関与する遺伝子群の発現増加、heme 分解に関与する遺伝子群の発現に低下がみられた。今後、P70R がこれら代謝系にどのように関与するかを解析する必要がある。

②acyl-CoA 誘導体を用いた解析

ABCD1~3 は acyl-CoA の輸送に関与する可能性が示唆されていることから、photoaffinity 光親和性プローブとしてジアジリンとビオチン基を導入した長鎖脂肪酸 CoA を合成した。この基質をラット肝より精製したペルオキシソームと incubation し、光照射後試料を SDS-PAGE にかき、Streptavidin を結合した horseradish peroxidase と incubation し、結合タンパク質を chemiluminescence 法により検出した。その結果、この基質は peroxisomal multifunctional enzyme と特異的に結合したが、ABCD1~3 とは結合しなかった。今後、photoaffinity label には CoA 部分を保持した基質の合成が必要であることが示唆された。

③酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いた ABCD タンパク質発現系の構築

ABCD1~4 の機能を詳細に解析するためには、native の状態で ABC タンパク質をリポソームに再構成することともに X 線結晶解析に向けた大量精製が求められている。そこで、これまで同定されている全生物種の ABC タンパク質 D 群の cDNA を準備し、C 末端へ GFP を融合させ His-ABCD-GFP として *Pichia pastoris* に発現させることを試みた。現在 17 種類の ABCD 遺伝子を発現させ、TALONE Metal Affinity Resin で精製し、Gel filtration でタンパク質の性状を解析した。その結果、ヒト ABCD4、線虫 pmp-3、pmp-5 が比較的安定したダイマー構造をとることが示唆された。今後、可溶化条件を検討し、ABC タンパク質 D 群の構造と機能を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

① Sato Y., Shibata H., Nakatsu T., Nakano H., Kashiwayama Y., Imanaka T., and Kato H.: Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. EMBO J. 29, 4083-4093, 2010. 査読有

② Kashiwayama Y., Tomohiro T., Narita K., Suzumura M., Glumoff T., Hiltunen J. K., Van Veldhoven P. P., Hatanaka Y., and Imanaka T.: Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative. J. Biol. Chem. 285, 26315-26325, 2010. 査読有

③ Iwashita S., Tsuchida M., Tsukuda M., Yamashita Y., Emi Y., Kida Y., Komori M., Kashiwayama Y., Imanaka T., and Sakaguchi M.: Multiple organelle-targeting signals in the N-terminal portion of peroxisomal membrane protein PMP70. J. Biochem. 147, 581-590, 2010. 査読有

- ④ Kashiwayama Y., Seki M., Yasui A., Murasaki Y., Morita M., Sakaguchi M., Tanaka Y., Imanaka T.: 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH₂-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of ABC subfamily D proteins. *Exp. Cell Res.* 315, 190-205, 2009. 査読有
- ⑤ Sato Y., Shibata H., Nakano H., Matsuzono Y., Kashiwayama Y., Kobayashi Y., Fujiki Y., Imanaka T., and Kato H.: Characterization of the interaction between recombinant human peroxin Pex3p and Pex19p: Identification of TRP104 in Pex3p as a critical residue for the interaction. *J. Biol. Chem.* 283, 61346-6144, 2008. 査読有

[学会発表] (計 24 件)

- ① 李朝香, 朝日彰子, 赤池宗輔, 柏山恭範, 守田雅志, 安川洋生, 今中常雄: ABC タンパク質サブファミリーD の細胞内局在化と N 末端アミノ酸配列. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.
- ② 東野和直, 上杉泰介, 柏山恭範, 今中常雄: 小胞体膜上に存在する ABC タンパク質 P70R (ABCD4) の存在状態と機能の解析. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会, 2010, 12, 7-10, 神戸.
- ③ Imanaka T.: Organelle selective targeting of ABC subfamily D proteins: Importance of NH₂-terminal hydrophobic motifs. 3th FEBS Special Meeting: ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases. 2010, 2, 27-3, 5, Innsbruck, Austria.
- ④ Kashiwayama Y., Morita M., and Imanaka T.: Importance of the NH₂-terminal hydrophobic motifs on the peroxisome selective targeting of PMP70. International Meeting on Peroxisome Research, 2009, 11, 19, Seattle, USA.
- ⑤ 柏山恭範, 関みどり, 安井暁奈, 守田雅志, 今中常雄: ABC タンパク質 D 群の細胞内局在は N 末端アミノ酸配列に依存する. 第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2008, 8, 7, 札幌.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/cellbiol/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今中 常雄 (Imanaka Tsuneo)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
教授
研究者番号 : 50119559

(2) 研究分担者

柏山 恭範 (Kashiwayama Yoshinori)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
助教
研究者番号 : 20401812