

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06510

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Functional analysis of translocon factors involved in the topogenesis of membrane proteins

研究代表者

阪口 雅郎（SAKAGUCHI, Masao）

兵庫県立大学・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） 3,300,000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。また、小胞体内腔の多機能シャペロンが合成共役型の膜透過に寄与するとする新規概念を見出した。

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. We also discovered a novel concept that multifunctional chaperones in the lumen of the endoplasmic reticulum contribute to synthesis-coupled protein translocation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質膜透過

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜タンパク質は、細胞の生命機能に必須な多様な役割を果たしている。それらの大半は小胞体で合成と同時に膜に組み込まれる。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、「受け入れ」、「スキャン」し、「膜内配向や配置」を決定する(図)。われわれの研究によって、このような膜タンパク質の構造形成を規定する3つの要因とその作用機構が明らかになってきた。すなわち、下記の【膜タンパク質構造形成の3要素】である。

膜への標的化と進入開始を規定する膜組み込み「開始シグナル配列」

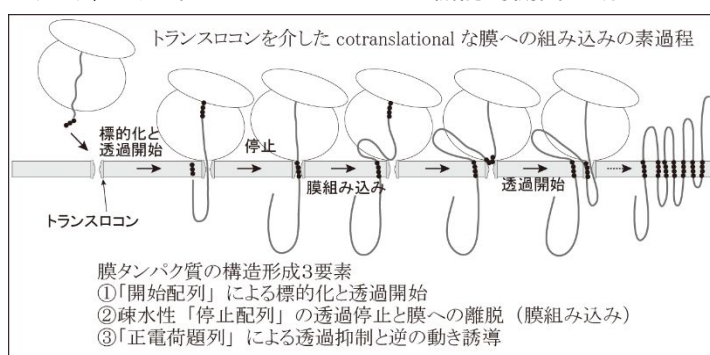
トランスロコンでの膜透過の動きを停止し膜貫通となる「疎水性停止配列」

トランスロコンでの動きを制御し配向を決定し膜貫通構造を規定する「正電荷配列」

これら3要素の組み合わせによって、各膜貫通配列は正しく組み込まれ、膜タンパク質の膜貫通トポロジーが形成される。

この過程でカギとなる因子「トランスロコン」については、生化学的ならびに遺伝学的解析によって個々の因子が明らかにされてきた。さらに構造情報が明らかになりつつある今日、これら3要素のトランスロコンによる識別実態、膜タンパク質の組み込みにおける新生鎖の動的側面、およびそれを制御し直接間接的にかかわる因子群の解明が次なる研究の焦点となってきている。

申請者は、これまで一貫して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、想定外のトランスロコンの機能的側面を明らかにしてきた。また、独自開発の膜透過状況



状況を感じることができる「フォールディングプローブ」を駆使して、生きている細胞内でのポリペプチド鎖の膜透過状況を簡便かつ定量的に評価し、トランスロコン作用の質的变化を検出することを可能としてきた。本研究は、それら独自の研究展開を基盤として、トランスロコン内でのポリペプチド鎖のダイナミクスを明らかにし、構造形成3要素の識別に関わる因子の系統的かつ網羅的な探索

を実行する。さらに、それらの機能解析を通じて、膜タンパク質の構造形成過程の解明を目的とした。

2. 研究の目的

(1) トランスロコンで正電荷残基によって誘起されるポリペプチド鎖の逆輸送ダイナミクス」の実像を明らかにする。これまで未解決だったトランスロコンポアにおける膜組み込みの競合や順序を調べ、構造形成3要素の機能ダイナミクスの真相を明らかにする。

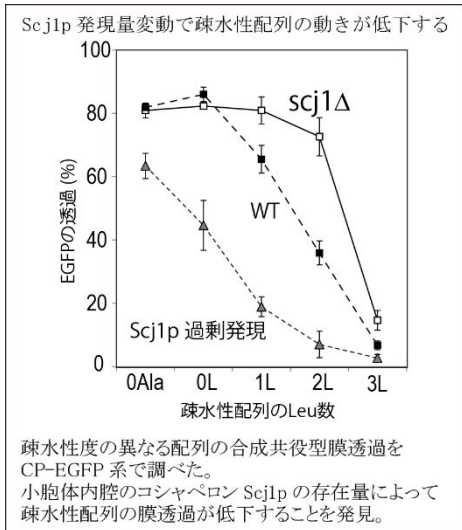
(2) 「膜タンパク質構造形成の3要素」の識別にかかわる因子の系統的網羅的探索

申請者は、フォールディングプローブによって、生きている細胞内でタンパク質の膜透過状況を定量的に解析できる実験系を設定し、トランスロコンによる3要素識別作用の簡便かつ定量解析を可能とした。このプローブはカプシドプロテアーゼドメインの特性を利用している。CPドメインはリボソームから出るとすぐにフォールディングし後方のペプチド結合を自己切断する。CPの後方にあるEGFPドメインの糖鎖付加を検出・定量するだけで、トランスロコンでの透過・滞留を感じることができる。これを用いて、細胞での正電荷による透過停止作用や、出芽酵母細胞での膜透過状況評価が可能となっている。すでに、この実験系によって、「出芽酵母遺伝子の変異によるトランスロコンの質的变化」が検知できることが示されつつあり、トランスロコンの機能制御遺伝子の網羅的な探索が可能と判断するに至った。そこで本研究では、申請者オリジナルの本プローブを駆使して、真核細胞の膜タンパク質構造規定3要素の識別に関連する遺伝子の網羅的に解析する。

(3) 3要素認識に関わる因子の機能解明：上記のプロセスで見出されるトランスロコンの質的変異株で、その遺伝子産物の機能解析を予備的に進めた結果、いくつかの遺伝子欠損で予期外の「3要素の識別変化」が明瞭に認められた。例えば、小胞体内腔のJドメイン-タンパク質(Hsp40)であるScj1pが疎水性セグメントの合成共役型透過に影響することが判明した(下図)。その他、透過孔に直接触れない因子が、新生鎖のダイナミクスに影響する例が複数見出されつつある。そこで、本研究では同様の3要素識別に関する機能変動解析を入手可能なすべての遺伝子破壊株に適用して実施する。トランスロコンの3要素識別の機能変化を検知できる世界初のシステムを駆使した因子探索を計画した。

3. 研究の方法

(A) トランスロコンにおける膜タンパク質構造形成ダイナミクス：



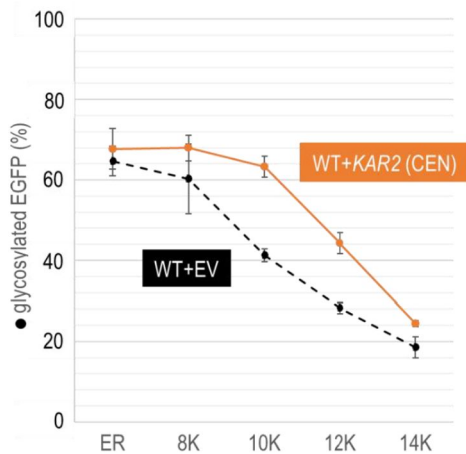
申請者の実績基盤のある無細胞タンパク質合成・膜透過実験系を駆使して、正荷電残基クラスタによるトランスロコン内での順逆ダイナミクスを探索する。モデルポリペプチド鎖に、正電荷クラスタ、糖鎖付加部位、フォールディング傾向の異なるドメイン、疎水性度の異なる配列、シャペロン (Bip) 認識傾向の異なる配列などを配置し、そのダイナミクスを生化学手法で解析する。ダイナミックなゆらぎと配列特性との相関を明らかにし、膜タンパク質構造形成時の動態解明につなげる。膜透過を新生鎖の糖鎖付加程度で定量し、逆輸送の動きを部位特異的に導入した Cys 残基への膜非透過性の PEG-マレイミドの反応性で定量解析する。いずれも、秒タイムスケールのダイナミクス情報を得る。また、最近確立した、「トランスロコンチャネルの部位特異的的化学架橋反応系」を活用して、新生鎖の滞留部位の解析を行う。

(B)「膜タンパク質構造形成 3 要素」の識別にかかわる因子の系統的探索：

フォールディングプローブを、疎水性度の異なるシグナルペプチドに適応、また、疎水性配列や正荷電配列のモデルタンパク質に適応し、各種遺伝変異株での挙動を追うことで、それぞれの要因認識に関する機能変化を追うことができる。例えば上図。具体的には、それぞれの CP-EGFP 融合プローブを一連の遺伝子欠損株に導入し、EGFP ドメインの透過程度をウエスタンブロットィングで調べる。チャネル本体など生育に必須な遺伝子に関しては、温度感受性変異株を用いて、その効果を 3 要素に対して調べる。

4. 研究成果

(A)(1)膜結合型リボソームから伸長してくるポリペプチド鎖が膜を貫通して定着する機構について、無細胞タンパク質合成・膜組み込み実験系を使って、膜組み込み過程を解析した。合成されてきたポリペプチド鎖の疎水性の高い配列部分が膜透過トンネルに進入した時点で膜内配置が決定するとする従来型の機構に加えて、一度膜のトンネルを通り抜けた後に、逆方向の動きが誘起され、膜透過トンネル部分に定着できる機構の実証を進めた。この新規な機構は、これまで説明できなかった、疎水性の不十分な膜貫通部分の膜定着を合理的に説明するものである。この機構には、私たちが見出してきた、正に荷電したアミノ酸残基による膜透過抑制と逆輸送誘起作用が直接的な要因になっていることも判明した。(2)タンパク質膜透過トンネルの作用機構に関わる遺伝子の探索では、これまでに 50 を超える遺伝子について、欠損によって疎水性配列の透過度、正電荷クラスタの透過度、シグナル配列の機能状況などに対する影響を定量解析してきた。透過トンネル通過を効率化する因子、抑制する因子、標的化を予想外にも抑制する因子など、興味深い機能が示唆される遺伝子を見出してきた。



(B)膜結合型リボソームから伸長するポリペプチド鎖が膜定着する機構について解析した。合成されるポリペプチド鎖の疎水性の高い配列部分が膜透過トンネルに進入した時点で膜内に定着し配置が決定する機構に加えて、一度膜透過チャンネルを通り抜けた後に、ポリペプチド鎖後方にある正荷電アミノ酸残基によって逆方向の動きが誘起され、疎水性の不十分なポリペプチド鎖が膜に定着する機構があることを実証することができた。この新規な機構は、これまで説明できなかった、複数回膜貫通膜タンパク質に多く存在する疎水性の不十分な膜貫通領域の膜定着を説明することが可能である。(2)タンパク質膜透過トンネルの作用効率に関連する遺伝子を探索して、欠損によって疎水性配列の透過、正電荷クラスタの透過、シグナル配列の機能効率などに大きく影響する遺伝子を見出してきた。なかでも特に、小胞体内腔の Hsp70-シャペロン Kar2p の過剰発現によって、疎水性配列のみならず正電荷クラスタの透過が大きく亢進することを発見した。また、小胞体内腔のシャペロン制御因子である J-タンパク質 Scj1p の欠損により膜透過が大きく亢進することを見いだした。小胞体における合成共役型ポリペプチド鎖膜透過が、内腔シャペロン系によって駆動されることの発見は、これまでリボソームによる合成伸長が駆動要因とされてきた「共役型」透過でも、内腔 Kar2p-J タンパク質シャペロン系が大きくかかわることを示し、これまでの通説を覆すものである。

腔の Hsp70-シャペロン Kar2p の過剰発現によって、疎水性配列のみならず正電荷クラスタの透過が大きく亢進することを発見した。また、小胞体内腔のシャペロン制御因子である J-タンパク質 Scj1p の欠損により膜透過が大きく亢進することを見いだした。小胞体における合成共役型ポリペプチド鎖膜透過が、内腔シャペロン系によって駆動されることの発見は、これまでリボソームによる合成伸長が駆動要因とされてきた「共役型」透過でも、内腔 Kar2p-J タンパク質シャペロン系が大きくかかわることを示し、これまでの通説を覆すものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Haque MS, Emi Y, Sakaguchi M.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A conserved WXXE motif is an apical delivery determinant of ABC transporter C subfamily isoforms.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Struct. Funct.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川井 拓哉, 小坂 優里菜, 阪口 雅郎
2. 発表標題 酵母小胞体内腔HSP70(KAR2) の合成共役型膜透過における作用機構の系統的解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田 英伸, 阪口 雅郎
2. 発表標題 小胞体トランスロコンを介した膜タンパク質形成時のタンパク質の動態の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田 昂輝, 衣斐 義一, ハック モハンマド=シャジェドオル, 阪口 雅郎
2. 発表標題 有機アニオントランスポーターOATP1B3の側底部細胞膜への極性局在化シグナルの探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------