

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370055

研究課題名(和文) 膜タンパク質の小胞体トランスロコンを介した膜組み込みと小胞体回避機構

研究課題名(英文) Integration of membrane proteins through the endoplasmic reticulum translocon and other organelle in the eukaryotic cells

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) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では真核細胞小胞体の膜タンパク質の膜組み込み系に関する研究を推進した。小胞体での疎水性配列の膜組み込みがリボソームによって制御されている可能性を見出し、小胞体トランスロコンでの膜透過が正荷電残基によって一時停止した後再開可能なことを発見し、天然のマルチスパン膜タンパク質の組み込みに低疎水性配列の強制的膜組み込み機構が作動していることを実証し、膜コレステロールの膜透過に対する多面的効果を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have addressed the protein integration through translocon on the endoplasmic reticulum in the eukaryotic cells and the targeting of membrane proteins to the other organelle. We demonstrated the follows; the membrane integration of hydrophobic sequences through translocon can be regulated by ribosomes. The movement of polypeptide chain is stalled by positively charged amino acid residues on the chain and then resumes. The forced membrane integration of marginally hydrophobic segment can be observed in the membrane integration of naturally occurring membrane protein. Cholesterol in the membrane exerts pleiotropic effects on the translocon function.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物科学

キーワード：膜タンパク質 シグナル配列 膜トポロジー 生体膜 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

真核細胞では、タンパク質は特定のオルガネラに局在化し、各オルガネラ独自の high 機能に貢献する。これらのプロセスにはタンパク質の膜透過や膜タンパク質の正確な膜組み込みが必須で、細胞に備わったタンパク質輸送因子や標的化因子が関与する。小胞体では「トランスロコン」と呼ばれるタンパク質膜透過チャンネルが、膜透過と膜組み込みの両方に必須の役割を果たすことが明らかにされつつあったが、膜タンパク質の配列単位とトランスロコンサブユニットとの相互関係や、タンパク質が膜脂質に移行するときのダイナミクス、他のオルガネラへの標的化機構との相互関係などは明らかではなかった。本研究では、我々独自の研究を基盤とし『膜タンパク質の小胞体トランスロコンを介した膜組み込みと小胞体標的化回避』の全体像の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1)小胞体トランスロコンでの膜タンパク質の組み込みについて。小胞体トランスロコンにおける膜タンパク質の膜への進入、膜貫通部分の配向決定、膜組み込み途上でのポリペプチド鎖のダイナミクス、膜貫通セグメントのアセンブリと膜環境への移行を探索した。無細胞タンパク質膜組み込み実験系で、小胞体のトランスロコンを通じた膜透過や膜組み込みを任意に停止・再開できる実験系を確立し、膜透過の負荷となる正電荷アミノ酸残基を活用してポリペプチド鎖の動きを抑制し、駆動作用や動きの観察が可能となっていた。ここでは、マルチスパン膜タンパク質の組み込みと膜環境への移行の制御、リボソームとトランスロコンの協調による膜組み込み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と膜組み込み機構。疎水性膜貫通セグメントをもつ膜タンパク質は、疎水性配列をシグナルとする機構によって小胞体へ標的化される。一方、ペルオキシソームやミトコンドリアの膜タンパク質は疎水性セグメントを有するにもかかわらず、この強力な機構を回避し、合成後にオルガネラへ標的化される。すなわち、小胞体への標的化以前に何らかの仕分けが存在すると考えられた。我々はマルチスパン膜タンパク質でありながら特定のアイソフォームがペルオキシソームやミトコンドリアに局在する ABC 輸送体を取り上げ、小胞体回避機構を調べ、ミトコンドリア ABC 輸送体 (B10 アイソフォーム) のシグナル配列が小胞体回避機能を有すること、ペルオキシソームの D3 アイソフォーム (PMP70) のアミノ末端 12 残基 (N12-モチーフ) が強力な小胞体回避機能をもつことを発見していた。本研究では、N12-モチーフの作用機構に焦点をあて、結合因子の分離同定と N12 モチーフの作用で抑制される小胞体標的化機構の素過程を探索した。

(3)トランスロコンでのポリペプチド鎖のダイナミクスについて。小胞体トランスロコンでのポリペプチド鎖の動きに対する、疎水性及び荷電残基の作用、リボソームの寄与を解析し、トランスロコンにおけるポリペプチド鎖の動態制御に関する情報を集めることをめざした。正電荷による透過制御の分子機構と、ポリペプチド鎖の透過抑制ではじめて観察可能となった新しい膜透過の素過程の生化学解析に重点をおいた。

3. 研究の方法

(1)小胞体トランスロコンでの膜タンパク質の組み込みについて。高効率膜透過活性を有する精製粗面小胞体を添加した無細胞タンパク質合成系を用い、系統的にデザインしたポリペプチド鎖の膜透過挙動を精査した。膜上での存在状態は、小胞体内腔で起きるオリゴ糖鎖の付加、膜外部からのタンパク質分解酵素処理、膜外部からの高分子量化合物との反応状況を指標として解析した。ポリペプチド鎖の伸長直後から、経時的な状況変化を追跡する際には、伸長を阻害剤で停止させた後、状態変化を追跡した。

4. 研究成果

(1)小胞体トランスロコンでの膜タンパク質の組み込みについて。

粗面小胞体でのポリペプチド鎖の膜透過の際、内腔において付加する糖鎖はポリペプチド鎖の留め置き要因として作用し、内腔への動きを駆動することを明らかにした (Yamagishi ら 2011)。特に、疎水性セグメント近傍への糖鎖付加は、その部分が膜に留まるか、透過してしまうかを決定する膜トポロジー決定要因としても作用することを示唆した。

ポリペプチド鎖の小胞体膜透過において、ポリペプチド鎖に存在する正電荷アミノ酸残基が透過抑制作用を持ち、動きを一時停止させることを明らかにした。さらに、一時停止後緩やかに動き得ること、その動き抑制作用は静電的相互作用によっていること、動き停止作用は膜透過チャンネル入り口部分で発揮されていることなどを明らかにした (Fujita ら 2011)。

小胞体トランスロコンでの膜透過において、中程度疎水性セグメントが一時停止するものの、カルボキシル末端がリボソームに保持されているときに限って、停止後に内腔側へ動きうることを発見した。リボソームがトランスロコンに対して影響を及ぼし、機能を制御していること、および膜タンパク質の膜組み込みをリボソームが制御することを示した (Onishi ら 2013)。

小胞体トランスロコンでポリペプチド鎖のアミノ末端側上流を膜透過に導くシグナル配列 (型シグナルアンカー配列) の発揮する駆動作用を定量的に見積もることに成功し、赤血球マルチスパン膜タンパク質 (バ

ンド3タンパク質)の膜組み込みに内在性型シグナルアンカーが貢献していることを証明した(Yabukiら2013)。

無細胞タンパク質膜透過実験系を整備する過程において、膜結合リボソームから終止コドンによるポリペプチド鎖の解離のためには終止コドン下流に塩基配列の延長が必要なこと(Takaharaら2013)、膜透過反応が膜のコレステロールによって多面的に影響を受けること(Yamamotoら2012)、フォスファチジルセリン結合タンパク質によって膜透過が抑制されること(Yamamotoら2013)などを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

- (1) Emi, Y., Harada, Y., and Sakaguchi, M. (2013)
Involvement of a di-leucine motif in targeting of ABCC1 to the basolateral plasma membrane of polarized epithelial cells
Biochem. Biophys. Res. Commun., 441, 89-95
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.013.
- (2) Yabuki, T., Kida, Y., Morimoto, F., and Sakaguchi, M. (2013)
Membrane translocation of luminal domains of membrane proteins powered by downstream transmembrane sequences
Mol. Biol. Cell, 24, 3123-3132
DOI: 10.1091/mbc.E13-04-0210.
- (3) Onishi, Y., Yamagishi, M., Imai, K., Fujita, H., Kida, Y., and Sakaguchi, M. (2013)
Stop-and-move of a marginally hydrophobic segment translocating across the endoplasmic reticulum membrane
J. Mol. Biol., 425, 3205-3216
DOI: 10.1016/j.jmb.2013.05.023.
- (4) Yamamoto, H., Kida, Y., and Sakaguchi, M. (2013)
Phosphatidylserine-binding protein lactadherin inhibits protein translocation across the ER membrane
Biochem. Biophys. Res. Commun., 434, 620-626
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.131.
- (5) Takahara, M., Sakaue, H., Onishi, Y., Yamagishi, M., Kida, Y., and Sakaguchi, M. (2013)
Tail-extension following the termination codon is critical for release of the nascent chain from membrane-bound ribosomes in a reticulocyte lysate cell-free system
Biochem. Biophys. Res. Commun., 430, 567-572
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.11.112
- (6) Yamamoto, H., Fujita, H., Kida, Y. and Sakaguchi, M. (2012)
Pleiotropic effects of membrane cholesterol upon translocation of protein across the endoplasmic reticulum membrane
Biochemistry, 51, 3596-3605.
DOI: 10.1021/bi2018915
- (7) 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., 125, 3133-3143.
DOI: 10.1242/jcs.099549.
- (8) 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.
DOI: 10.1242/jcs.086850
- (9) 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.
DOI: 10.1093/jb/mvr011
- (10) 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.
DOI: 10.1093/jb/mvq131

以上すべて査読有

[学会発表](計33件)

- (1) 大西由希子、山岸麻里芙、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の膜組み込みはリボソームによって維持される可動性準安定状態を経由する / A primitive unstable state prior to membrane integration of transmembrane segment via ER translocon(第86回日本生化学会大会口頭発表・ポスター: 2013年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県))
- (2) 木田祐一郎、石原裕大、藤田英伸、阪口雅郎
膜透過途上にあるポリペプチド鎖と小胞体トランスロコンとの相互作用解析 / Interaction between the ER translocon and translocating polypeptide chain(第86回日本生化学会大会口頭発表・ポスター: 2013年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県))
- (3) 衣斐義一、阪口雅郎
上皮細胞においてABCC1とABCC2の極性局在化を制御するシグナルの解析 / Distinct cis-acting determinants in the first

- cytoplasmic loop domain control apico-basal distribution of ABCC1 and ABCC2 (第86回日本生化学会大会ポスター: 2013年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県))
- (4) 木田祐一郎、石原裕大、藤田英伸、阪口雅郎
粗面小胞体上のリボソームが膜貫通配列を認識する(第65回日本細胞生物学会大会・ポスター、シンポジウム「細胞の中の生々流転-「もの」の動態に基づく機能制御」: 2013年6月19-21日、ウインクあいち(愛知県))
- (5) 松岡絢香、横山雄一、衣斐義一、阪口雅郎
ABCC2のapical側細胞膜への極性輸送の制御に関わるシステイン残基(第65回日本細胞生物学会大会・ポスター: 2013年6月19-21日、ウインクあいち(愛知県))
- (6) 大西由希子、山岸麻里芙、藤田英伸、木田祐一郎、阪口雅郎
タンパク質膜透過におけるトランスロコン内での疎水性セグメントの準安定な保持について(第13回日本蛋白質科学会年会・ポスター: 2013年6月12-14日、とりぎん文化会館(鳥取県))
- (7) 姜公秀、高原教代、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におけるタンパク質膜透過の一時停止を検出する方法論の開発とその有用性(第13回日本蛋白質科学会年会・ポスター: 2013年6月12-14日、とりぎん文化会館(鳥取県))
- (8) 木田祐一郎、石原裕大、藤田英伸、阪口雅郎
リボソーム-トランスロコン複合体における疎水性配列の識別機構(第85回日本生化学会大会口頭発表・ポスター: 2012年12月14-16日、福岡国際会議場(福岡県))
- (9) 藤田英伸、木田祐一郎、阪口雅郎
小胞体膜トランスロコンにおいて正電荷アミノ酸により引き起こされるポリペプチド鎖の逆方向への動き(第85回日本生化学会大会・ポスター: 2012年12月14-16日、福岡国際会議場(福岡県))
- (10) 阪上春花、岩下昌平、木田祐一郎、阪口雅郎
膜タンパク質の小胞体標的化を抑制するアミノ末端モチーフの解析(第85回日本生化学会大会・ポスター: 2012年12月14-16日、福岡国際会議場(福岡県))
- (11) 大西由希子、山岸麻里芙、藤田英伸、木田祐一郎、阪口雅郎
小胞体トランスロコンにおけるポリペプチド鎖膜透過の速度論: 少数の正電荷による膜透過減速効果
(第85回日本生化学会大会・ポスター: 2012年12月14-16日、福岡国際会議場(福岡県))
- (12) 姜公秀、高原教代、大西由希子、藤田英伸、木田祐一郎、阪口雅郎
細胞内での小胞体トランスロコンにおけるタンパク質膜透過の一時停止を解析する(第85回日本生化学会大会・ポスター: 2012年12月14-16日、福岡国際会議場(福岡県))
- (13) 衣斐義一、原田泰江、阪口雅郎
ABCC1のbasolateral側細胞膜への極性局在化を制御するシグナルの解析(第85回日本生化学会大会・ポスター: 2012年12月14-16日、福岡国際会議場(福岡県))
- (14) Sakaguchi, M.
小胞体トランスロコンを介した新生ポリペプチド鎖の動きの制御/Dynamic behavior of nascent polypeptide chain through translocon regulated by positive charges, hydrophobic sequences, and ribosome(第12回日本蛋白質科学会年会・シンポジウム「細胞内のタンパク質動態と細胞機能: Protein dynamics and cellular functions」, オーガナイザー、遠藤斗志也: 2012年6月20-22日、名古屋国際会議場(愛知県))
- (15) 木田祐一郎、矢吹隆明、藤田英伸、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構造形成(第12回日本蛋白質科学会年会・ワークショップ「in vivo 蛋白質科学: 構造形成と分解」, オーガナイザー、稲葉謙次、中戸川仁: 2012年6月20-22日、名古屋国際会議場(愛知県))
- (16) 大西由希子、山岸麻里芙、藤田英伸、木田祐一郎、阪口雅郎
リボソームは小胞体トランスロコンを介した膜貫通セグメントの形成を制御する(第12回日本蛋白質科学会年会・ポスター: 2012年6月20-22日、名古屋国際会議場(愛知県))
- (17) 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ポリペプチド鎖の動き(第12回日本蛋白質科学会年会・ポスター: 2012年6月20-22日、名古屋国際会議場(愛知県))
- (18) Emi, Y. and Sakaguchi, M.
Distinct cis-acting determinants in the first cytoplasmic loop domain control apico-basal distribution of the ATP-binding cassette transporter family C isoforms(第45回日本発生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会・ポスター: 2012年5月29-31日、神戸国際会議場(兵庫県))
- (19) Sakaue, H., Iwashita, S., Kida, Y., and Sakaguchi, M.
Analysis of N-terminal motif suppressing ER-targeting(第45回日本発生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会・ポ

- ター：2012年5月29-31日、神戸国際会議場（兵庫県）
- (20) 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、パシフィコ横浜（神奈川県））
- (21) 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（第34回日本分子生物学会年会・ポスター：2011年12月13-16日、パシフィコ横浜（神奈川県））
- (22) 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、国立京都国際会館（京都府））
- (23) 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、国立京都国際会館（京都府））
- (24) 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、国立京都国際会館（京都府））
- (25) 藤田英伸、山岸麻里芙、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、国立京都国際会館（京都府））
- (26) 山岸麻里芙、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、国立京都国際会館（京都府））
- (27) 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、国立京都国際会館（京都府））
- (28) 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、国立京都国際会館（京都府））
- (29) 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、兵庫県立大学（兵庫県））
- (30) 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、北海道大学（北海道））
- (31) Sakaguchi, M., Iwashita, S., Yamashita, Y., 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、北海道大学（北海道））
- (32) 藤田英伸、木田祐一郎、山岸麻里芙、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、ホテル阪急エキスポパーク（大阪府））
- (33) 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、ホテル阪急エキスポパーク（大阪府））
- 〔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 (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