

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657106

研究課題名(和文)小胞体トランスロコンでのタンパク質輸送の一分子解析

研究課題名(英文)Single molecule observation of protein translocation through translocon

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) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞の小胞体のトランスロコンで進行するタンパク質の膜透過は、生命現象の基本的現象の一つである。本研究では、トランスロコンのチャネル内でのタンパク質のポリペプチド鎖の動きを一分子レベルで観察することに挑戦した。トランスロコン内の動きを同調的に追跡する実験系を確立し、ポリペプチド鎖上に存在する2-3残基の正荷電アミノ酸残基によって動きが著しく減速することを実証した。

研究成果の概要(英文)：Protein translocation through translocon on the endoplasmic reticulum in the eukaryotic cells is one of the most critical bases to maintain the life of the cells. The challenge in this project was to establish the experimental system by which the movement of the polypeptide chain through translocon can be observed at the single molecule level. We have set up the system in which we can observe protein translocation synchronously across the membrane and found that only 2-3 positively charged amino acid residues slow down the movement through translocon.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：シグナル配列 生体膜 オルガネラ

### 1. 研究開始当初の背景

細胞におけるタンパク質の膜透過や膜組み込みは、生命活動の根幹の一つである。真核細胞では大半の膜タンパク質の膜組み込み、すべての分泌タンパク質の膜透過を小胞体膜が担っている。小胞体膜には『トランスロコン』と呼ばれるタンパク質膜透過チャネルが存在し、膜透過および膜タンパク質の膜への組み込みに必須の役割を果たしている。我々は、一貫して小胞体トランスロコンにおけるタンパク質の膜組み込みを研究し、トランスロコンの驚異的な柔軟性の発見、正電荷の膜透過抑制作用の実証、正電荷によって誘導される疎水性セグメントの逆輸送と膜貫通状態形成の発見などの成果をあげてきた。それらの研究基盤をもとに、透過の駆動機構、動きの制御、膜タンパク質の膜内配向形成機構、などの理解のために、トランスロコンでのポリペプチド鎖の動きをリアルタイムに一分子レベルで知ることが重要との認識に至った。計画当初、すでに休止状態のバクテリアトランスロコンの結晶構造が明らかにされ、また関連因子が判明しつつあったが、ポリペプチド鎖の動きについての情報は乏しかった。トランスロコンを通したポリペプチド鎖の動きを一分子レベルで観測することは有意義な情報を与えるにもかかわらず、実験的な困難さから実現できていなかった。

### 2. 研究の目的

無細胞タンパク質合成・小胞体膜透過実験系を整備し、トランスロコンにおけるポリペプチド鎖の動きを一分子レベルで計測し、ポリペプチド鎖のゆらぎ頻度、動き速度、配列による動きの変化を実測可能とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

効率的な一分子観察のために、無細胞タンパク質合成・膜透過実験系を至適化する。(1)ポリペプチド鎖の無細胞合成。無細胞タンパク質合成系で蛍光標識アミノ酸をポリペプチド鎖の特定部位に導入する。その至適条件を設定する。(2)蛍光プローブの位置変化の観測。蛍光消光剤を用いて蛍光プローブの動きを検出可能とする。(4)モデルポリペプチド鎖の動き解析。ポリペプチド鎖の前後の動きのダイナミクスパラメータを解析する。生化学解析が詳細になされてきたモデルタンパク質を手始めに解析する。(5)ダイナミクス解析。得られる透過頻度、温度効果、ゆらぎ、配列依存性などをもとに動きの詳細を解析する。

### 4. 研究成果

(1) streptavidin binding peptide tag (SBP-tag) を有するポリペプチド鎖を無細胞系で合成し、トランスロコンの存在する粗面小胞体膜に移行させ、streptavidin との

結合によって膜透過時の動きを一時的に抑制し、biotin によって同調的に透過を開始させることに成功した。(2)その動きは、膜脂質に存在するコレステロールによって多面的に大きく影響されることを見出した。(3)リボソームからポリペプチド鎖をピューロマイシンによって解離させることで同調的に透過を開始させる観察系も設定できた。その際、リボソームでの終止コドンの作用が下流の配列に依存することを見出した。(4)整備された実験系を使って、ポリペプチド鎖の動きを秒単位の時間分解能で解析することが可能になった。これで、ポリペプチド鎖上に存在する2 - 3残基の正電荷アミノ酸残基によって動きが著しく遅くなること、疎水性アミノ酸残基はある閾値以上の数で協調的に作用すること、などを見出した。この実験系でのポリペプチド鎖の蛍光ラベルを検討した。最適化には至っていないが、一分子観察につながる成果を得た。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7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.

以上すべて査読有

〔学会発表〕(計 19 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))

[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