

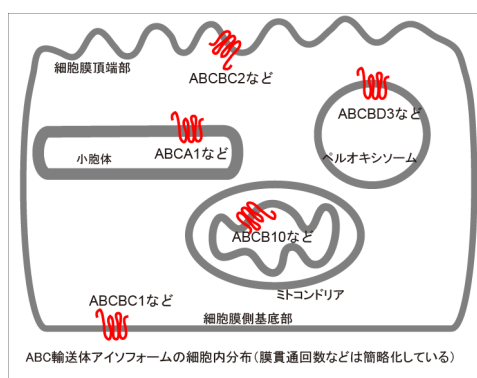
「真核細胞における ABC 輸送体のオルガネラ選別輸送」

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

阪口 雅郎

1 研究の背景と目的

真核細胞内には、様々な膜オルガネラが存在している。それぞれの膜系に、特異的な膜タンパク質が局在化して独自の機能を発揮し、細胞の生命活動が維持されている。我々は、このような膜タンパク質の細胞内局在化の分子機構の解明を目指している。本研究課題では、典型的な多数回膜貫通タンパク質である、ATP 結合カセットを有する輸送タンパク質 (ABC 輸送体) の「細胞内配送機構」に焦点をあてた。ABC 輸送体は、単一生物種に多くの類似タンパク質が存在する、いわゆる遺伝子ファミリーを構成する。これらが、それぞれ特定の細胞内オルガネラに配置され、独自の機能を発揮する (左図)。たとえば、B 群アイソフォームはミトコンドリア、D



郡はペルオキシソーム、C1 は細胞膜側基底部分、C2 は細胞膜頂端部分に局在化する。これらの ABC 輸送体は、それぞれの部位で、様々な物質輸送に必須の役割を担い、細胞や臓器の老廃物排出、必要な物質の搬入、などを担う。また、がん細胞においては、抗がん剤を排出することによって、がん細胞の抗がん剤耐性の原因になる。このようなことから、基礎研究にとどまらず、医学・薬学・農学の多方面で活発に研究さ

れている。今回、本研究課題では、ABC 輸送体ファミリーのなかで、ペルオキシソームに局在する ABC 輸送体 (ABCD3 アイソフォーム) に焦点をあて、特異的局在化機構を明らかにすることを目的とした。ABC 輸送体ファミリーに着目することで、互いに配列が類似するにもかかわらず局在部位が異なる分子同士を比較対照しながら研究を進めることができ、有意な情報を得ることができる。具体的目標としては、高い疎水性を持つ ABC 輸送体が小胞体への移行標的化を免れる分子基盤の解明を目指した。

2 研究方法・研究内容

本研究では、細胞質のリボソームで合成される ABC 輸送体 D3 アイソフォームをペルオキシソームへ正確に送り込むために必要な小胞体回避機構に焦点をあてる。我々は、これまでに、ミトコンドリア内膜に存在しヘムの輸送などにかかわる ABC 輸送体、ABCB10 アイソフォームの局在化機構を解析し、アミノ末端 140 アミノ酸残基の配列にトコンドリア局在化に必要な配列 (mitochondria targeting sequence, MTS) が存在すること、その MTS が無い場合には後方の疎水性配列によって小胞体に移行すること、MTS は小胞体移行を抑制する特異な機能を持っていることなどを明らかにし、「膜タンパク質の小胞体回避配列」という概念を提案し、証明してきた (Miyazaki ら、Mol. Biol. Cell, 2005)。これらの研究基盤を発展させ、ペルオキシソーム膜タンパク質の ABCD3 の局在化と小胞体標的化回避との関連を明らかにする。

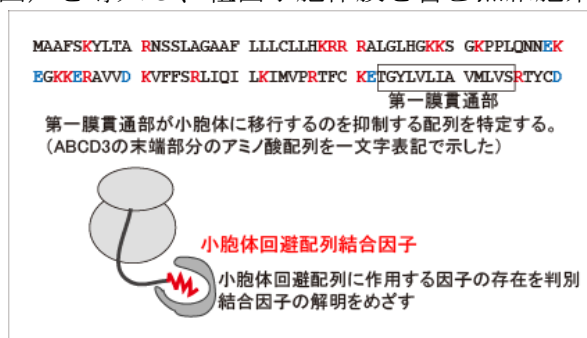
研究対象とする ABCD3 アイソフォームは、ペルオキシソーム膜に局在化し、代謝物の輸送に重要な役割を担う。これまでの申請者の研究で、D3 アイソフォームのアミノ末端部が膜タンパク質の小胞体標的化を抑制することが判明しつつある。

本研究では、具体的に次の3点について逐次研究を展開する。

- ①小胞体回避作用に必要十分なアミノ酸配列（モチーフ）の特定
- ②小胞体回避モチーフの作用機序の生化学解析
- ③小胞体回避モチーフ結合タンパク質の同定

【1】必要十分な配列の確定

シグナル配列に対する小胞体回避モチーフの作用を定量的に評価するために、無細胞タンパク質合成・膜透過実験系を使用する。小胞体標的化シグナル（下図、第一膜貫通配列）を有するポリペプチド鎖の上流アミノ末端側に評価すべき配列（下図）を導入し、粗面小胞体膜を含む無細胞系で合成し、小胞体膜への組み込み程度



を小胞体によるアスパラギン結合糖鎖の付加によって評価する。付加した配列に小胞体回避効果がある場合には、糖鎖付加が抑制される。抑制程度合いを定量化することで小胞体回避活性を表現できる。この系で、様々な欠損体、アミノ酸置換体を合成し、機能を評価する。変異体は、標準的な DNA 操作実験技術を用いて作成する。

無細胞タンパク質合成実験には、ウサギ網状赤血球溶血液を使用する。粗面小胞体は、イヌ臍臓より高度に精製したものを使用する。これらの実験基盤は十分有している。

【2】小胞体回避モチーフの機能の生化学解析

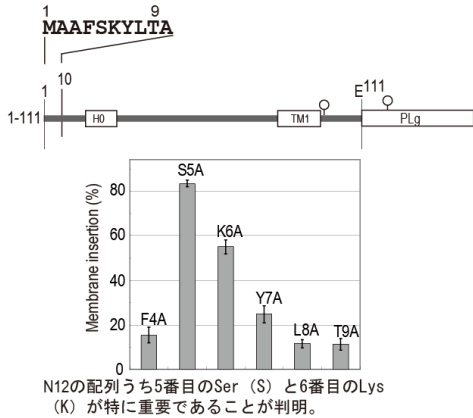
モチーフ競合阻害実験に、合成ペプチドまたは GST 融合タンパク質を用いる。融合タンパク質は DNA 操作技術を用いて、融合タンパク質 DNA を作成し、大腸菌高度発現システムを用いて発現し、グルタチオン樹脂を用いた親和性カラムによって精製する。合成ペプチドは、実績ある合成化学会社に委託する。これらを、前述の無細胞実験系に添加して、小胞体標的化への効果を定量的に調べる。もし、モチーフに結合する因子に関わる場合には、これらの添加によって、小胞体移行率が上昇するはずである。

【3】小胞体回避モチーフ結合タンパク質の同定

小胞体回避モチーフに結合する因子を探索するために、化学架橋反応および親和性精製手法を使う。前述のモチーフ配列と GST との融合タンパク質を樹脂に固定化したカラムを作成し、細胞からの抽出液をカラムにかけることによって、結合するタンパク質を分離する。また、無細胞系では、合成途上のポリペプチド鎖がリボソームに結合したままの状態を作出することができる（上図参照）。これを用いれば、合成途上に起きる小胞体移行の阻止が細胞内に近い状態で再現できる。その状態に対して、化学架橋剤を適応し、結合する因子の情報を得る。無細胞合成されるものは、ラジオアイソトープ標識されているために、架橋産物が分子量の大きな産物として明確に検出可能である。また、新奇な方法として、ビオチン化酵素 (BioID) 法を考慮する。タンパク質にビオチンを付加する酵素の変異体で、近接するタンパク質に非特異的にビオチン化反応を起こす。BioID に小胞体回避モチーフを融合し、培養細胞内で発現させることによって、モチーフに親和性のあるタンパク質が優先的にビオチンが導入される。ビオチン標識後は、ビオチンに結合するストレプトアビジンカラムによる親和性クロマトグラフィーによって候補タンパク質を精製する。

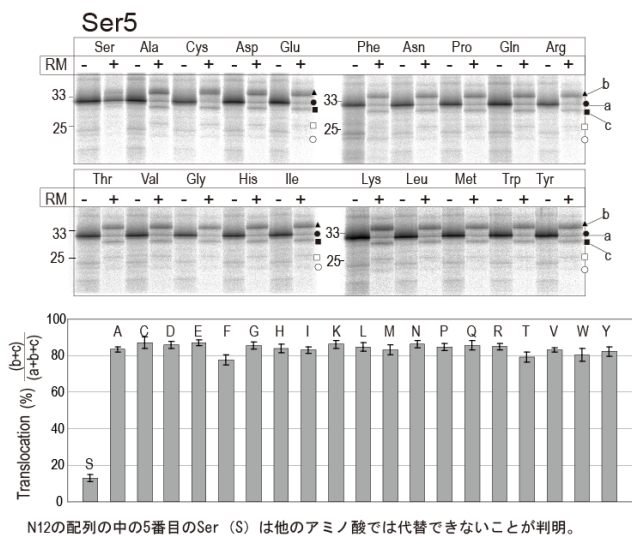
3 研究成果

(1) 必要配列の確定：ABCD3 (D3 と略す) の小胞体標的化を無細胞実験系で詳細に調べた。無細胞実験系は、膵臓より調製された粗面小胞体膜を添加した、網状赤血球の抽出液を用いた。D3 分子の第一膜結合部分 (上図) を含む部分およびその配列変異体の小胞体標的化を調べた。この実験系では、小胞体に標的化され膜の中に入った場合には、タンパク質鎖に糖鎖が付加され、電気泳動で明確に判別できるのである (たとえば左下図)。



その結果、D3 のアミノ末端 12 残基内に小胞体標的化を抑制する作用があることを大まかな欠失実験で突き止めた。さらに、系統的欠損実験の結果、N 末端 12 残基以内にその活性が限定された。それを、小胞体標的化抑制モチーフと命名し「N12」と略称することとした。さらに各アミノ酸残基をアラニン (Ala) に変換して変異効果を見る、アラニ

ンスキャニング実験を実行した結果、特に 5 番目のセリンと 6 番目のリシン残基の重要なことが判明した (左上図)。5 番目のセリン残基を 19 種のアミノ酸残基に替えて作用を無細胞系で調べたところ、それ以外の残基では作用が認められなかった。

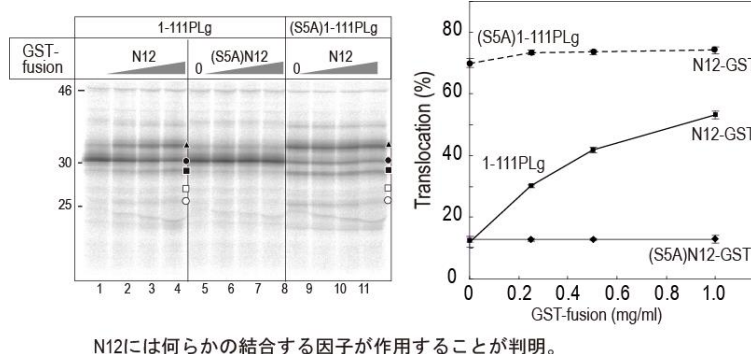


(Ala) に変換して変異効果を見る、アラニンスキャニング実験を実行した結果、特に 5 番目のセリンと 6 番目のリシン残基の重要なことが判明した (左下図)。この 5 番目には Ser でなければならないことが判明し、明確な配列要求性があると結論した (左下図)。この N12 を ABCD3 に関連のない、分泌タンパク質の N-末端に付加したところ、無細胞系でも、培養細胞内でも小胞体標的化シグナル配列の作用を協力的に抑制した。

これらの事実より、ABCD3 のアミノ末端にあるこの 12 残基の配列は、厳密なアミノ酸配列を要求する配列特異性を有し、一般的な小胞体標的化機能を抑制することができるかと判断した。そこでこれを、

“小胞体標的化抑制モチーフ (N12)” と命名した。

(2) 作動性結合タンパク質が寄与することを証明



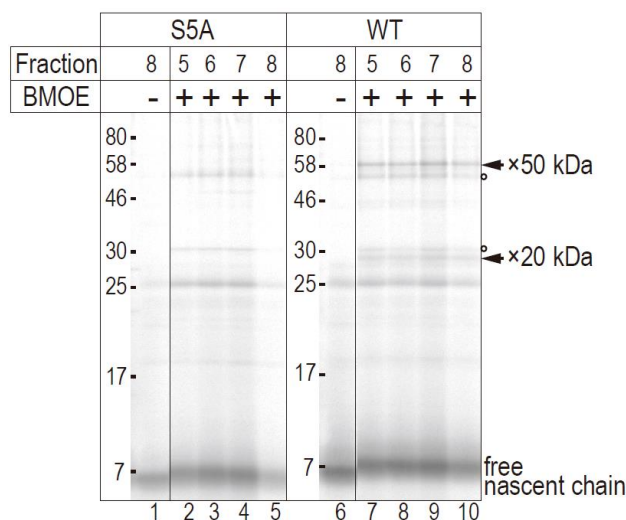
N12 の作用機構として、その配列自体が後続のシグナル配列の作用を抑圧する可能性と、その配列に作用するタンパク質因子が存在する可能性が考えられた。これらを区別するために、次のような拮抗阻害実

験を行った。N12 配列およびその配列の重要な 5 番目の Ser を Ala に変換した合成ペプチドを作成し、無細胞実験系に導入したところ、N12 配列のペプチドを添加した場合に、N12 の作用が阻害され小胞体への標的化が見られた。同様な実験を N12 を N-末端に付加した GST タンパク質を大腸菌で発現させ、精製したものでも行った(左図)。この場合も、N12-融合 GST ではその添加量に応じて N12-をもつタンパク質の小胞体標的化(縦軸は膜透過=translocation % で表示)が見られるようになった。この結果は N12 に何らかの作用因子が結合し、N12-GST の添加でその因子が不足するため N12 の効果が阻害されると結論された。

(3) N12 配列作用性因子の検出系を確立

N12 配列の結合する因子の検出に考えられる様々なアプローチを試みた。すなわち、N12-GST 融合タンパク質を用いた親和性クロマトグラフィー、N12-配列と相互作用する因子を遺伝学的に選択する酵母ツーハイブリッドスクリーニング、N12-と相互作用するものを細胞内でビオチン化して検出しようとする BioID システム、などであった。しかし、いずれの戦略でも有意な結合因子の検出には至らなかった。

最後の検出候補として、化学架橋反応による検出を試みた。N12-シグナルペプチド



N12には分子量約5万と約2万のタンパク質が結合することが判明。

融合タンパク質を無細胞合成し、システインの SH-基と反応する反応基を 2 つ有する化学架橋試薬で処理したところ弱ながらも特異的な架橋産物が検出された。その反応効率を高める試みを行い、無細胞合成産物をショ糖密度勾配遠心によって部分精製した後架橋反応を行うと明確な産物が検出されることを見出した(左図)。この架橋産物は、N12 の Ser を Ala に変換したものでは認められないことから、確かに配列を識別しているものであることがわかった。

現在この化学架橋反応を指標にして、結合タンパク質のクロマトグラフィーによる精製を行っており、候補タンパク質が絞られ、電気泳動で分離し、質量分析によって同定を試みているところである。

4 生活や産業への貢献および波及効果

ここで研究対象とする ABC 輸送体は生理的に重要なさまざまな物質の輸送や、がん細胞の薬剤耐性、植物の増殖制御など、多様な生命現象と密接に関連している。得られる局在制御に関する知見は、多方面へ貴重な情報を提供する。また、ABC 輸送体の局在化不全に起因する遺伝疾患の病因解明や、治療戦略の策定にも寄与できる。世界的にみると、ABC 輸送体の研究者は非常に多く、特に医学・薬学・農学関連領域で応用を意識した研究が活発に行われているが、基礎的かつ綿密な実験的研究が待たれている。