

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 趙 貞 和

真核細胞は細胞内の膜系を発達させ、各コンパートメントが独特な働きをすることで高度な生命活動を果たしている。小胞輸送は各コンパートメントに蛋白質や脂質などを供給する重要なシステムで、ゴルジ体は、それらの修飾・成熟化と輸送先の仕分けを行う中心的オルガネラである。本研究は、小胞体(ER)由来の輸送小胞がゴルジ体に融合する初期過程に関わる遺伝子産物の研究をまとめたもので、本文は3章からなっている。

研究の背景を論じた序論に続く第1章では、Uso1蛋白質と膜構造の関係を検討した。Uso1は、ER由来輸送小胞のゴルジ体への移行が高温で停止する変異株から発見された遺伝子産物で、206Kの蛋白質がcoiled coil二量体となった巨大分子である。従来の抗体の特異性に問題があったため、新たにmycエピトープをC末端に持つ染色体上の遺伝子を構築し、Uso1-myc蛋白質が野生型と同様に機能することを確認した。従来、Uso1は大部分が細胞質にあるが、数%が超遠心で沈降すると示唆されていた。申請者は、特異性の高いモノクローン抗体9E10を使い、やはり少量のUso1-mycが膜画分に沈降し、界面活性剤で一部分が可溶化されることを認めた。これはUso1の膜への結合を示唆するが、この画分を蔗糖密度勾配の底におき、遠心で浮揚するか調べると、対照のゴルジ体膜蛋白が浮揚するのにUso1-mycはその位置を変えなかった。このようなUso1の奇妙な挙動の発見は、膜との相互作用の特殊性を示唆し、その後の研究発展の重要な礎石となった。

第2章では、ゴルジ体early領域の特徴を生化学的に明らかにするため、膜蛋白質を標的とした免疫吸着法を種々検討し、特異的な小胞の精製に成功した。ゴルジ体は、ERに近い側からearly-medial-lateと呼ばれる、機能的・構造的に異なる層盤からなると考えられている。しかし、各層盤を分けて調べようとする試みは、密度勾配遠心による粗分画しかされておらず、工程の煩雑さ・所要時間・精製純度のいずれも詳細な解析に適さないことは明らかであった。申請者は、myc/9E10系の特異性の高さとmyc標識した多くの蛋白質が本来の構造と機能を保持していることに注目し、免疫吸着をゴルジ体分画に適用することを試みた。ER由来の輸送小胞が最初にゴルジ体に到着するearly領域を対象とし、そのtSNAREとして研究が進んでいるSed5を吸着標的に選んだ。第1章同様に染色体上でmyc-*SED5*遺伝子を構築し、正常な機能を持つことを確認した上で、種々の条件検討を行った。細胞破壊はガラスビーズで行い、そのS50画分から小胞を9E10で免疫吸着した。吸着担体にはホルマリン固定した*Staphylococcus*菌体であるPansorbinを用いた。吸着された小胞の成分はTriton X-100による膜の可溶化で回収し、各コンパートメントのマーカー蛋白質の分布をウエスタンブロットで検定した。ER

やlateゴルジ体のマーカーは存在せず、ゴルジ体の糖転移酵素Mnt1, Mnn9, Van1 やSed5の結合相手のSec22が多く存在することからゴルジ体early領域を主とする小胞が回収されたことが示された。更に、染色で検出可能な主要蛋白質成分について、N末端アミノ酸配列を決定したところ、ERーゴルジ間をシャトルするEmp24, Erv25, Erp2などや、機能未知の分泌蛋白質Ssp120、従来エンドソームにあると予想されていたYpt52があることが分かった。この方法により、機能不明の成分の役割や、Sed5をもつ小胞がどのように形成されどうなっているかを詳細に調べられるようになった。

第3章では、第2章で発見された機能未知の新規膜蛋白質Yml067cについての解析結果がまとめられている。Sed5小胞の主要蛋白質の1つとして申請者が発見したYml067cは、ゲノム塩基配列上の推定ORFとしてしか知見がなかったものである。遺伝子破壊株は致死的でないが、15℃でコロニーを形成できない温度感受性を示した。アミノ酸配列上は、広くヒト・ハエ・線虫・植物などに同サイズの相同蛋白質が存在することから、何らかの重要な機能を持つと期待される。酵母でこれと相同性を待つ、やはり新規な膜蛋白質Yal042wは、Triton X-100可溶化後の免疫沈降でYml067cと特異的に結合していることが明らかになり、これらがSed5小胞ではたしている機能が注目される。

以上、本論文は、酵母を材料に小胞輸送の初期過程に関わる各種遺伝子産物を調べて、特異的なゴルジ小胞の精製を可能にし、更に新規な遺伝子産物の存在を明らかにした。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。