

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 : Multiple roles of Arf1 GTPase in the yeast exocytic and endocytic pathways (小胞輸送における酵母 *ARF1* の多面的機能の解析 —複数の輸送系への関与とその制御機構—)

氏名 矢原夏子

#### <序論>

細胞膜によって囲まれたひとつの区画しか持たない原核細胞に比べ、真核細胞は細胞内膜系を獲得することによって、緻密に機能分化したオルガネラの発達を可能とし、原核細胞から劇的な進化を遂げたと言える。真核細胞内の小胞体やゴルジ体は、それぞれの区画の独自性を保ちながらも互いに膜をやり取りし、小胞体上のリボソームで合成されたタンパク質を働くべき所まで運ばなければならない。その過程は小胞を介した小胞輸送のシステムによって厳密な制御を受けている。この運び手となる小胞として、古くから知られるクラスリン小胞に加え、COPI, COPII 小胞と呼ばれる一連のコートタンパク質を擁する被覆小胞の存在が確認されている。

小胞輸送は、ドナー膜からの輸送小胞の出芽・形成、アクセプター膜との融合・接着という一連の反応から成り立っており、その過程において、さまざまな GTPase が反応の ON/OFF を司る分子スイッチとして重要な役割を果たすことが知られている。ADP-ribosylation factor (Arf) は、酵母からヒトに至るまで全ての真核細胞に存在する GTPase であり、COPI 小胞の構成因子のひとつとして COPI の出芽形成を制御するとされている。Arf と近縁の Sar1 が、COPII 小胞の出芽形成を制御し小胞体からゴルジ体への輸送を担っていることが、*in vivo*, *in vitro* の両方で証明されているのに対し、Arf が働く輸送ステップについてその理解は混沌としたままとされている。Arf は主に動物培養細胞を用いた *in vitro* の実験から、ゴルジ体層板間、小胞体からゴルジ体への順方向輸送、ゴルジ体から小胞体への逆方向輸送、エンドソームリソソーム系などさまざまな輸送系に関与することが示唆されてきてはいるものの、*in vivo* での解析が非常に乏しいために、実際に生体内で Arf 1 分子がこれら複数の輸送系を制御し得るのか、もしそうならばどのようなメカニズムによって制御しているのか、等といった疑問は解明されていない。

本研究では、Arf の役割を *in vivo* で解析することを目的とし、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の強力な分子遺伝学のバックグラウンドを用いて *ARF1* の温度感受性変異株の単離を行った。*arf1* 温度感受性変異株の解析を行うことによって、Arf の機能を生体内で解析し、複数の輸送系への関与を生きた細胞内で検証するとともに、多岐に渡る輸送系に対する Arf の制御機構について解明していくことを目指した。

#### <結果と考察>

##### 1. *arf1* 温度感受性変異株アレルを 8 個単離した。

修士過程において、出芽酵母 *ARF1* の温度感受性変異株の単離を行った。スクリーニングの際には、*ARF1* の機能的ホモログである *ARF2* による機能的相補を避けるため、 $\Delta arf1 \Delta arf2$  二重破壊株において ORF 全体に PCR を用いてランダムに変異を導入した *ARF1* を発現させた。温度感受性を示す変異遺伝子について、複数変異が入っているものについては温度感受性を引き起こすアミノ酸変異を決定し、最終的に制限温度下で生育できないような新奇の *arf1* 変異遺伝子群を 8 個 (*arf1-11*~*arf1-18*) 単離した (図 1, 表 1)。変異遺伝子産物の作用を安定な状態で調べるために、これらの変異遺伝子を  $\Delta arf1 \Delta arf2$  二重破壊株のゲノム中に組み込み、以下の解析を行った。また同様の条件で野生型の *ARF1* を挿入した株 (以下  $\Delta arf2$  と示す) も作成し、完全な野生株と同じであることを常にコントロールとして確認することとした。

## 2. *arf1* 温度感受性変異株はアレル特異的な輸送損傷を示した.

変異 *arf1* 遺伝子の輸送経路における影響を、次のような手法を用いて調べた. (1) 液胞タンパク質であるカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) およびアルカリフォスファターゼ (ALP) をマーカーとしたパルスチェイス (図 2). (2) 細胞外分泌タンパク質であるインベルターゼのパルスチェイス (図 3). (3) CPY の細胞外へのミスソーティング (図 4 A). (4) 小胞体タンパク質である BiP の局在異常 (細胞外へのもれ) (図 4 B). (5) general な分泌のアッセイ (図 5). (6) 蛍光色素 FM4-64 のエンドサイトーシス系による細胞内への取り込み (図 6). (7) Rer1p と GFP の融合タンパク質の局在の変化 (図 7). Rer1p は定常状態では小胞体とゴルジ体の間をリサイクリングしながらゴルジ体シス領域に局在しているが、ゴルジ体から小胞体への逆輸送に損傷がある変異株では過って液胞へ輸送されるため、ゴルジ体から小胞体への逆輸送損傷を調べることが出来る (佐藤ら, 投稿中). (8) 電子顕微鏡による形態観察 (図 8, 9, 10).

特徴的なアレルについて、その表現形を以下に記述する.

- *arf1-11* のアレルは、著しい小胞体からゴルジ体への輸送損傷 (図 2, 3, 5) および顕著な小胞体膜の蓄積 (図 8) など、COPII の変異株同様、典型的な小胞体からゴルジ体への輸送損傷の表現形を示した. ところが EGFP-Rer1p の局在を調べたところ、*sec13* など COPII の変異株で見られたような小胞体像は観察されず、弱い液胞の染色が観察された. この結果から、*arf1-11* では小胞体からゴルジ体への順方向輸送のみでなく、ゴルジ体から小胞体への逆輸送にも損傷が生じていると考えられる. また、*arf1-11* では EGFP-Rer1p のリング状の構造が観察され、FM4-64 染色においても同様なリング状の構造が見られたことから、エンドソームから液胞までの輸送系にも損傷が生じており、EGFP-Rer1p や FM4-64 がエンドソームで蓄積していると考えられる.

- *arf1-13* のアレルは、電子顕微鏡によって、制限温度 1 時間では肥大したエンドソーム (MVB: multivesicular body) 様の構造の蓄積が見られ (図 9 A), 2~4 時間たつとその構造体は減少し、代わりに非常に複雑に入り組んだ形状を示す電子密度の高い液胞が観察された (図 9 B). 液胞の形態異常は FM4-64 においても観察された (図 6).

- *arf1-16* は EGFP-Rer1p の局在に異常が見られるだけでなく、著しい BiP の細胞外へのもれが観察された. BiP は HDEL シグナル配列を認識されることによってゴルジ体から小胞体へと送り返され、そのシステムは Rer1p に非依存的であることが知られている. よって *arf1-16* においては、Rer1p 依存的な逆輸送システムだけでなく、HDEL 配列認識による逆輸送にも損傷が生じていると考えられる.

- *arf1-18* は FM4-64 や EGFP-Rer1p が細胞質中に散在するような像が観察された. 疎水性の FM4-64 や 4 回膜貫通の膜タンパク質の Rer1p が可溶化されているとは考えにくく、なんらかの膜構造に蓄積していると考えられる. 電子顕微鏡による形態観察の結果、このアレルの細胞質中にはさまざまな種類や大きさの小胞の蓄積が観察されたことから (図 10), FM4-64 や EGFP-Rer1p はこれらの小胞に局在している可能性があると考えている.

以上のように、*arf1* 温度感受性変異株は、制限温度下での輸送損傷を網羅的に調べた結果、アレル特異的な輸送損傷および形態異常の表現形を示すことが明らかとなり、Arf1p 1 分子がさまざまな輸送系に関与することが示された.

## 3. *arf1* 温度感受性変異株はアレル間において遺伝子内相補が成立した.

多機能性タンパク質において、異なる変異株同士をかけあわせることによってそれぞれの損傷を補いあい生育が回復するという遺伝子内相補と呼ばれる現象が以前から知られている. そこで、*arf1* 温度感受性変異株同士においても、遺伝子内相補が成り立つかどうかを検討した. 変異株同士のヘテロアレリックな 2 倍体を作成し、温度感受性を調べた結果、いくつかの *arf1* 温度感受性変異株の組み合わせにおいて遺伝子内相補が成立し (図 11), これらの変異アレルを 3 つの相補グループに分類することができた (表 2).

## 4. *arf1* 変異株の温度感受性をアレル特異的に抑圧する因子を単離した.

Arf1p 1 分子がどのようにして異なる複数の輸送系を制御しているのかを明らかにするために、*arf1* 温度感受性変異株の多コピーサプレッサーのスクリーニングを行った. これまでのところ、著しい温度感受性を示す *arf1-11* および *arf1-16* のアレルにおいて、複数の抑圧因子を単離することに成功している. これらの因子は *arf1* 温度感受性変異株をアレル特異的に抑圧することから、Arf1p が周辺因子を使い分けることによって、複数の輸送系を制御していることが示唆された.

### <結論>

*arf1* 温度感受性変異株を複数単離し、それらがアレル特異的な輸送損傷を示し、アレル間において遺伝子内相補が成立することを示した. また *arf1* 温度感受性変異株の温度感受性を抑圧する因子を単離し、アレル特異的な抑圧活性を示した. 以上の結果から、出芽酵母 Arf1p が細胞内において、複数の輸送系を制御する多機能タンパク質として作用していると結論した. また同時に、その多機能性をこの温度感受性変異株で分離することができた. 今後この *arf1* 温度感受性変異株をツールとして用いることにより、Arf が関与する小胞輸送の制御システムについてその分子メカニズムの全体像を解明していきたい.

### 参考文献

Multiple Roles of Arf1 GTPase in the Yeast Exocytic and Endocytic Pathways.

Natsuko Yahara, Takashi Ueda, Ken Sato, and Akihiko Nakano. Mol. Biol. Cell, Volume 12, Number 1, January, 2001 掲載予定.

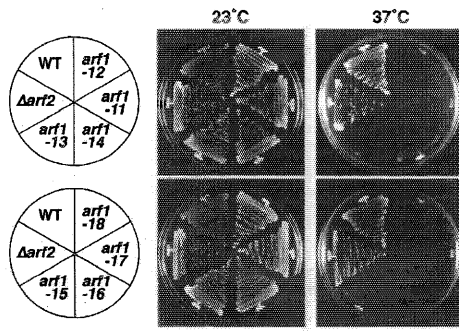


図1 *arf1* 温度感受性変異株 (*arf1-11*, *arf1-12*, *arf1-13*, *arf1-14*, *arf1-15*, *arf1-16*, *arf1-17*, *arf1-18*), およびコントロールとして野生株,  $\Delta arf2$  を, YPD プレート上で各温度にて3日間生育させた.

mutation points	
<i>arf1-11</i>	K38T E132D L173S
<i>arf1-12</i>	K38T
<i>arf1-13</i>	L173S
<i>arf1-14</i>	F51I
<i>arf1-15</i>	L25P
<i>arf1-16</i>	E41V D129E
<i>arf1-17</i>	E41V
<i>arf1-18</i>	H80P

表1 *arf1* 温度感受性変異株のアミノ酸変異点

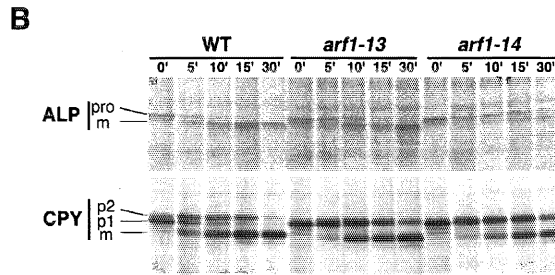
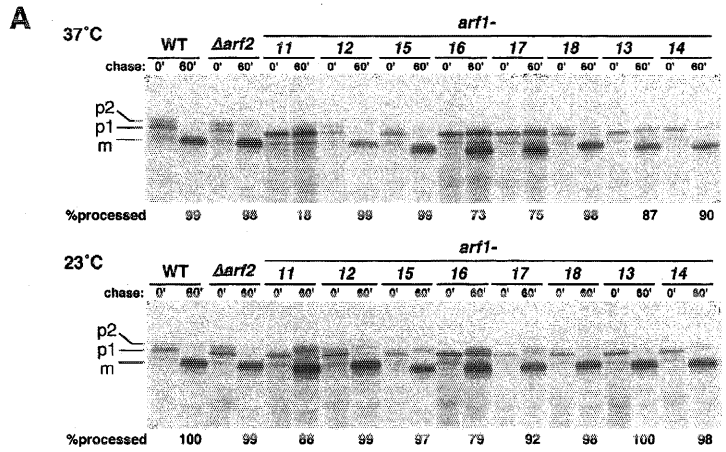


図2 *arf1* 温度感受性変異株における液胞タンパク質の細胞内輸送。(A) カルボキシペプチダーゼY (CPY) のパルスチェイス. それぞれの変異株, およびコントロールとして野生株,  $\Delta arf2$  においてパルスチェイス実験を行った. p1, p2, mはそれぞれ小胞体, ゴルジ体, 液胞型の分子種を示す. (B) *arf1-13* と *arf1-14* におけるCPYとアルカリフォスファターゼ (ALP) の輸送の比較 (37°C). ALPの pro, mはそれぞれ前駆体型, 成熟型 (液胞型) の分子種を示す. 液胞タンパク質の輸送においてアレル特異的な損傷が見られた.

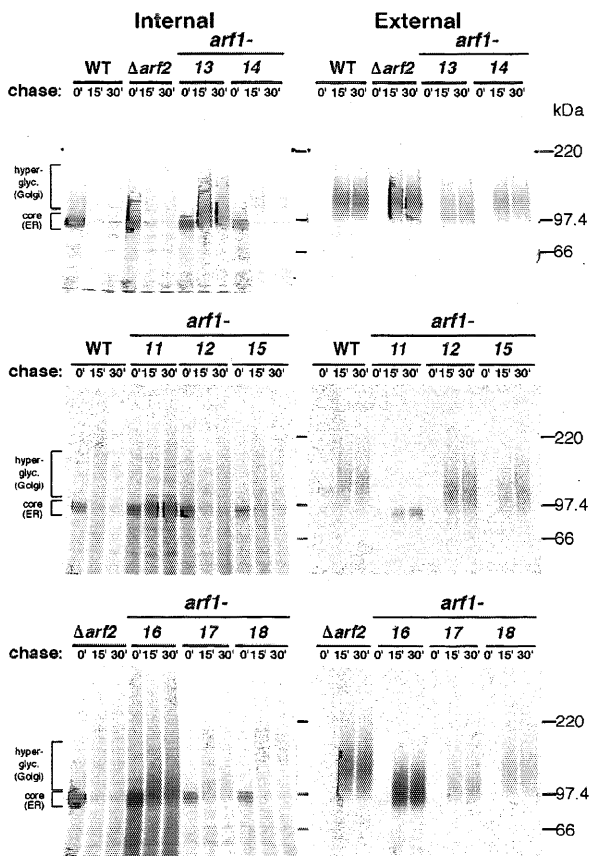


図3 *arf1* 温度感受性変異株における細胞外分泌タンパク質, インベルターゼの輸送. それぞれの変異株, およびコントロールとして野生株,  $\Delta arf2$  において制限温度 (37°C) 下でパルスチェイス実験を行い, 各点において遠心により細胞と培地を分け, 細胞内に留まっている分 (Internal) と細胞外に分泌された分 (External) を各々 SDS-PAGE で解析した. インベルターゼの輸送においてもアレル特異的な損傷が見られた.

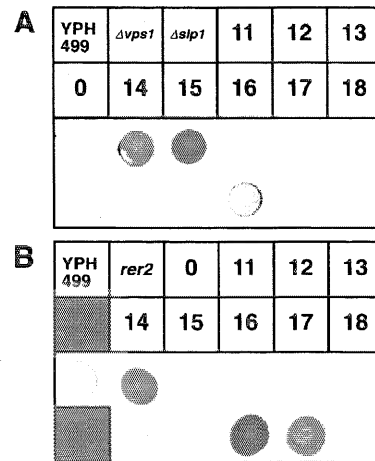


図4 抗CPY (A) または抗BiP (B) 抗体を用いたコロニープロットング. 半許容温度 (35°C) にて, *arf1-16* ではCPYの細胞外へのミスソーティングが, また *arf1-16* および *arf1-17* ではBiPのもれが観察された.

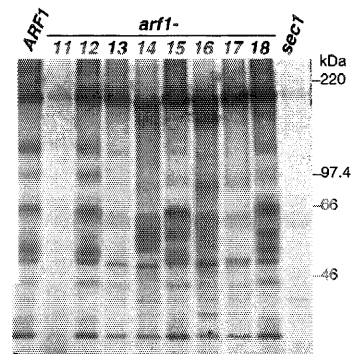


図5 generalな分泌のアッセイ. 細胞をラベル後, 培地を回収, TCA沈殿した後, SDS-PAGEで解析し, 制限温度 (37°C) 下で培地中に分泌されたタンパク質を調べた. *arf1* 温度感受性変異株では培地中へのタンパク質の分泌にアレル特異的な損傷が見られた.

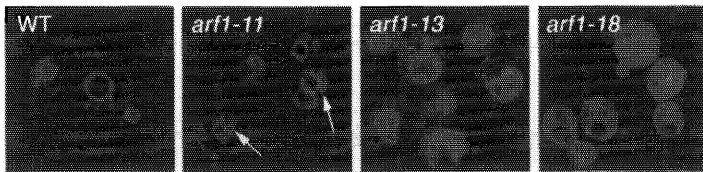


図6 *arf1* 温度感受性変異株における FM4-64 の取り込み。制限温度 (37°C) で 1 時間培養した細胞を、50mM FM4-64 を含む培地で 10 分間ラベルし、洗浄後、1 時間の後蛍光観察を行い、色素の取り込みを調べた。 *arf1-11* ではリング状の構造 (矢印) が観察され、 *arf1-13* では液胞の形態に異常が見られた。また *arf1-18* では FM4-64 が細胞質中に蓄積していた。 Bar; 5  $\mu$ m.

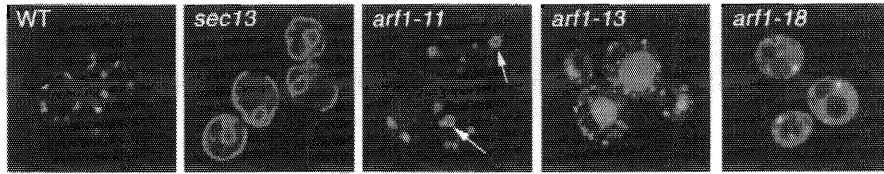


図7 *arf1* 温度感受性変異株における EGFP-Rer1p の局在異常。細胞を制限温度 (37°C) で 1 時間培養後、小胞体とゴルジ体間をリサイクリングする EGFP-Rer1p の局在を調べた。 *sec13* では小胞体からゴルジ体への輸送が阻害されるが、ゴルジ体から小胞体への逆輸送は正常に機能するため、EGFP-Rer1p が小胞体に蓄積し、小胞体像が観察される (佐藤ら、投稿中)。これに対し *arf1-11* では小胞体像は観察されず、リング状の構造 (矢印) と弱い液胞の染色が見られた。 *arf1-13* においても EGFP-Rer1p の液胞へのミソソーティングが観察された。また *arf1-18* では EGFP-Rer1p が細胞質中に蓄積していた。 Bar; 5  $\mu$ m.

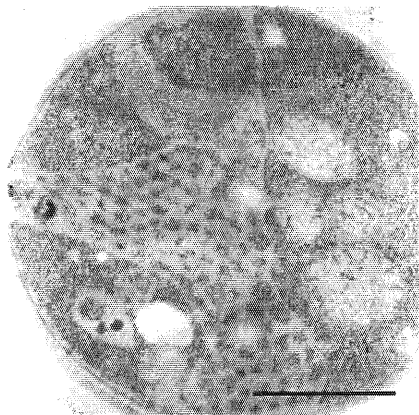


図8 *arf1-11* の電子顕微鏡による観察像。 *arf1-11* の細胞を制限温度 (37°C) で培養、急速凍結置換法によって固定後酢酸ウラン染色を行い、電子顕微鏡を用いて観察を行った。 Bars, 1.0  $\mu$ m. 顕著な小胞体膜の蓄積が観察された。

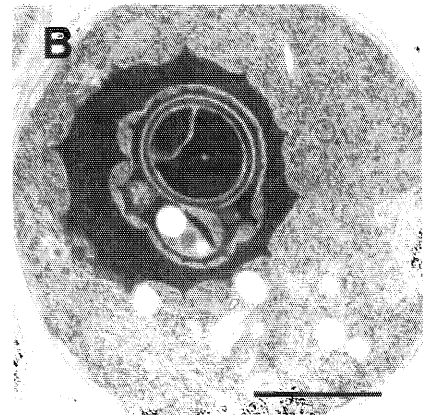
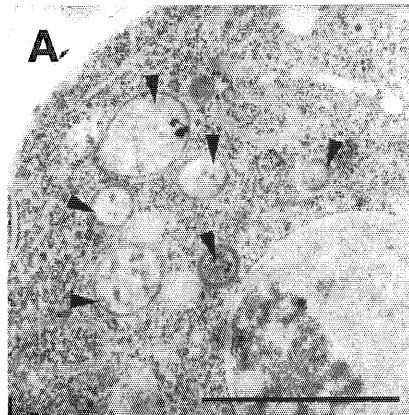


図9 *arf1-13* の電子顕微鏡による観察像。 *arf1-13* の細胞を 37°C で 1 時間 (A) および 4 時間 (B) 培養し、固定後、電子顕微鏡を用いて観察を行った。 Bars, 1.0  $\mu$ m. *arf1-13* では 37°C で 1 時間で MVB 様の構造 (矢頭) の蓄積が、4 時間で液胞の形態異常が観察された。

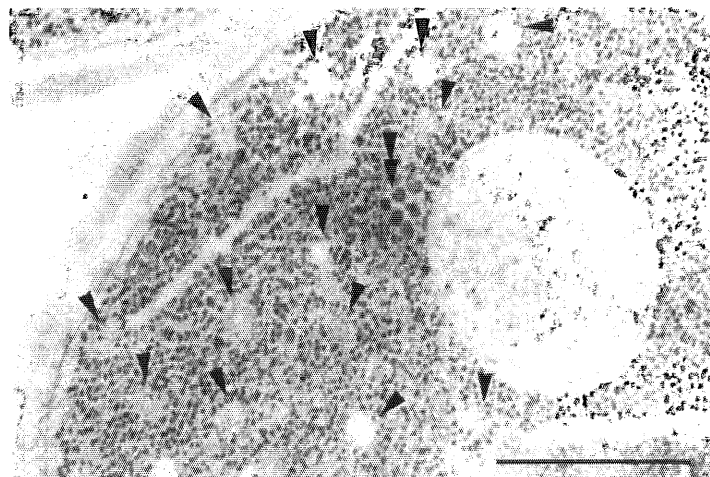


図10 *arf1-18* の電子顕微鏡による観察像。 *arf1-18* の細胞を 37°C で 1 時間培養し、固定後、電子顕微鏡を用いて観察を行った。 Bars, 500nm. *arf1-18* ではさまざまな小胞 (矢頭) の蓄積が観察された。

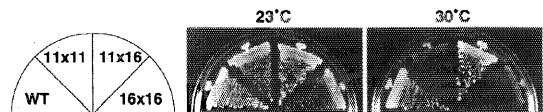


図11 *arf1* 温度感受性変異株のアレル間において遺伝子内相補が成立した例を示す。 *arf1-11* と *arf1-16* のホモの 2 倍体 (11x11, 16x16) は 30°C では生育できないが、2 つのアレルをかけあわせたヘテロアレリックな 2 倍体 (11x16) は生育可能となった。

	0a	11a	13a	14a	16a	17a	18a
0a	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11a	+++	-	-	-	+++*	+	++
13a	+++	-	-	-	-	+	+++
14a	+++	-	-	-	+	+++	+++
16a	+++	+++*	-	+	-	-	+++
17a	+++	+	+	+++	-	-	+++
18a	+++	++	+++	+++	+++	+++	-

表2 *arf1* 温度感受性変異株間における遺伝子内相補。野生型 (0) および各変異株 (11 - 18) 同士のホモまたはヘテロアレリックな 2 倍体の制限温度 (37°C. \*のみ 30°C) における生育を +/- で示す。 *arf1* 温度感受性変異株は遺伝子内相補が成り立つ 3 つの相補グループに分類できた。