

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成10年度博士課程進学

氏名 小曾戸陽一

指導教官名 依田幸司

論文題目 出芽酵母による小胞体-ゴルジ体間小胞輸送の研究

出芽酵母は真核生物のモデル系として、これまでに様々な生命現象の解明に役立ってきた。近年の細胞生物学において最も盛んな分野の一つといえる蛋白質小胞輸送の研究においても、出芽酵母から得られた研究成果なくして、現在到達したほどの理解はあり得ないだろう。本論文は、小胞体からゴルジ体に至る小胞輸送においていくつかの蛋白質装置が果たす機能未知の役割について、出芽酵母を用い遺伝生化学的解析を行った結果をまとめたものである。

真核生物において、蛋白質が機能を果たす場所に行くには、正しい輸送がおこなわなければならない。細胞内小器官を移動する際、蛋白質は輸送小胞と呼ばれる生体膜によって包まれる。輸送小胞は、ひとつの小器官から出芽し、次の目的地である標的器官の膜にたどりつき、中身を標的の膜の内側に取り込ませる。この過程は高い精度で行われなければならない。これまでに、SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor [NSF] attachment protein [SNAP] receptors)、Rabファミリー、Uso1ファミリー、そしてSec1ファミリーといったその正確性を担うと考えられる蛋白質装置が多くの真核生物から同定されている。

本研究では出芽酵母の小胞体-ゴルジ体間のSec1ファミリーであるSly1蛋白質に着目し

た。*SLY1*遺伝子は、そのアミノ酸の1残基が置換された変異により、Rabファミリーである*ypt1*の欠失による致死性をバイパスすることから1991年に同定された。この変異により多くの小胞体-ゴルジ体間の温度感受性変異が相補されること、さらに*SLY1*遺伝子内の異なる箇所の変異により制限温度下で小胞体-ゴルジ体の小胞輸送が停止することから、*SLY1*は小胞輸送における幾つかの段階に影響すると予測された。また蛋白質レベルでは、Sly1はゴルジ体上のt(target)-SNAREであるSed5と強く結合することが報告されていた。このような知見を背景に、筆者はSly1に関する多面的研究を試みた。

## 1. Sed5蛋白質の相互作用の解析

Sed5蛋白質はその分子内に3カ所のコイルドコイルモチーフをもっており、その領域が他の蛋白質との相互作用に関与すると考えられた。本研究では、コイルドコイル領域のそれぞれ（N末端側からH1、H2、H3）及びSed5の細胞質部分の全長に、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）タグ、マルトースバインディングプロテイン（MBP）タグ、及びmycタグを付けた融合蛋白質を大腸菌内で発現するプラスミドを設計した。形質転換した大腸菌破碎液から、グルタチオンセファロースおよびアミロースレジンによるアフィニティ精製を行った。また同様の手法を用いて、出芽酵母の小胞体-ゴルジ体間のSNAPであるSec17、NSFであるSec18、そしてSly1にそれぞれGSTタグを結合した融合蛋白質を作製した。相互作用の検出方法として、Sed5及びその3カ所のコイルドコイル領域のC末端側のmycタグを抗myc抗体に結合させ、プロテインAセファロースビーズに吸着させた。さらにそのビーズを調べたい他の融合蛋白質と緩衝液中で緩やかに攪拌したのち、結合してくる蛋白質を同定した。

その結果、Sec17はSed5のC末端側のコイルであるH3部位と特異的に結合した。この領域は哺乳類のSec17ホモログである $\alpha$ -SNAPが、神経細胞細胞質膜のt-SNAREであるsyntaxin 1に結合する領域と相同性がある。これに対しSly1は、Sed5のN末端側のコイルであるH1に特異的に結合した。さらに、Sed5全長にSec17及びSly1が結合したとき、互いに競合しないことが明らかになった。またSed5のN末端側であるH1とH2をつなげた蛋白質（以下H1H2）は、C末端側のH3と結合した。Sed5の細胞質部分の全長には、H1H2とH3がそれぞれ結合した。この2つの結果からSed5のN末端側とC末端側には相互作用があることを見いだした。さらに、上記の通りSly1はSed5N末端側のH1と結合するが、それによってSed5のN末端とC末端の相互作用が阻害されることを明らかにした。これらの結果からSly1がSed5の構造を制御している可能性が示唆された。

## 2. 温度感受性変異型Sly1蛋白質を用いたSly1の機能解析

Sly1蛋白質のアミノ酸配列のうち266番目のアルギニンがリジンとなった変異株は、制限温度下で小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送が停止する。筆者はこの株の*sly1<sup>ts</sup>*遺伝子をサブクローニングし、その遺伝子産物であるSly1<sup>ts</sup>のGST融合蛋白質を作製した。その融合蛋白質を用いて第一章の手法による結合実験を行ったところ、Sed5と共沈してきたSly1<sup>ts</sup>型蛋白質は野生型Sly1に比べ大幅に量が減少していた。また酵母生体内でSly1-6myc、Sly1<sup>ts</sup>-6mycを発現させ、酵母破碎液からmyc抗体による免疫沈降を行いウエスタン解析を行ったところ、野生型に比べSly1<sup>ts</sup>型に結合していたSed5量は低下していた。これらの結果からSed5とSly1<sup>ts</sup>型蛋白質の結合性が野生型に比べ低下していることが明らかになった。ところが酵母破碎液を遠心分画に供したところ、配列上には膜貫通領域を持たないSly1蛋白質は、野生型およびSly1<sup>ts</sup>型ともに大部分が膜上に局在した。このことからSed5との結合以外に、Sly1を膜上に局在させる機構が存在することが示唆された。

また*sly1<sup>ts</sup>*株内で、*SEC18*遺伝子にHAタグを融合した遺伝子を本来の遺伝子と置換すると生育の阻害が観察された。そこで*sly1<sup>ts</sup>*株と*sec18*温度感受性株を掛け合わせ四分子解析を行ったところ、この両者の変異は合成致死となることが見いだされた。この現象からSly1の機能として、t-SNARE、v(vesicle)-SNAREの解離を起こすATPaseであるSec18の近傍で働くこと、すなわちSNARE間の結合、解離の段階を調節する可能性が考えられた。さらに詳細な実験を行うために、以下のような*in vitro*の実験系を構築した。6myc-Sed5および3HA-Bet1蛋白質を別々に発現させた二種類の膜画分を酵母破碎液から調製し、そこに大腸菌で作成した野生型Sly1およびSly1<sup>ts</sup>型の融合蛋白質を添加してインキュベートした後、免疫沈降法を用いて6myc-Sed5に結合している3HA-Bet1量を観察した。野生型Sly1蛋白質を加えたときはSly1<sup>ts</sup>型の添加時に比べて、Sed5-Bet1間の結合は増加していた。この結果からSly1の機能として、膜上のt-SNARE、v-SNAREの結合を促進する働きを持つことが考えられる。

## 3. *sly1*遺伝子の温度感受性変異を多コピーで相補する遺伝子の探索

さらに*SLY1*と遺伝学的に新規の相互作用を持つ遺伝子が存在するかどうかに興味を持たれた。そこで、*sly1<sup>ts</sup>*株の温度感受性を多コピーで抑制する遺伝子のスクリーニングを試みた。方法としては、酵母の多コピーゲノミックライブラリーを*sly1<sup>ts</sup>*株に導入し、制限温度下で生育可能となった酵母に含まれていた遺伝子を同定した。取得された遺伝子は9種類であるが、これらをその機能から5クラスに分類した。特徴的な遺伝子としては、前述のような生化学的解析を行ったv-SNAREである*BET1*、小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送

に働く *USO1*、また相互作用の機作については不明であるがCell wall stress sensorとして報告されている *WSC1*、*WSC2*および*MID2*などが挙げられる。

これらの他に、現在までに機能のわかっていない遺伝子である *HSS1* (=high copy suppressor of *sly1<sup>ts</sup>* mutant) が認められた。カルボキペプチダーゼYのパルスチェイス実験から、この遺伝子の多コピー発現により小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送が回復していたことが確認された。さらにHss1蛋白質にHAタグを結合し、生化学的な解析を試みた。遠心分画および間接蛍光抗体染色の結果から、Hss1は小胞体上に局在する膜蛋白質であることが明らかになった。また電子顕微鏡による観察では、*HSS1*の多コピー発現によって小胞体膜の増大が見受けられた。これまでのところHss1の正確な機能は不明であるが、その小胞体への高い局在性によって、*Sly1*を介する小胞輸送に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究では出芽酵母の小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送に働く *Sly1*に着目して、生化学および遺伝学の手法を用いた多面的アプローチを行った。第一章ではSed5の分子内結合に焦点を当てた微小な視点から、第二章ではSed5-Bet1のSNARE同士の分子間相互作用に対して、また第三章ではやや視点を広げ*in vivo*での小胞輸送系を用いた解析を行った。いずれの段階においても*Sly1*を中心とした、これまでに報告されていない知見を得ることに成功した。*Sly1*を含むSec1ファミリー蛋白質の機能はそれぞれの生物種により多岐にわたると考えられるが、出芽酵母を用いた本研究がその役割を解明するための一助になると期待される。

## 報文

Kosodo, Y., Noda, Y., and Yoda, K. (1998). Protein-Protein interactions of the yeast Golgi t-SNARE Sed5 protein distinct from its neural plasma membrane cognate Syntaxin 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 212-216.

Kosodo, Y., Imai, K., Hirata, A., Noda, Y., Takatsuki, A., Adachi, H., and Yoda, K. Multicopy suppressors of the *sly1* temperature-sensitive mutation in the ER-Golgi vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. (submitted).