

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小曾戸 陽 一

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役割を果たすことによって高度な生命活動を可能にしている。小胞輸送はこの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・成熟化や輸送先の仕分けを行う中心的オルガネラである。本研究は酵母を材料に用いて、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緒言に続く第1章では、tSNAREであるSed5蛋白質の分子レベルでの相互作用の解析結果が述べられている。Sed5蛋白質は、分子内に他の蛋白質との相互作用に関与すると考えられる3ヶ所のコイルドコイル領域をもっている。各領域（N末端側からH1, H2, H3）とその組合せに*myc* エピトープ・タグをつけ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）融合蛋白質として大腸菌で調製した。同様に、Sec17, Sec18, Sly1などの小胞輸送に働く蛋白質も調製した。これらを緩衝液中で混ぜ合わせ、抗*myc*抗体で結合してくる蛋白質を調べた。その結果、Sec17がSed5のC末端側のコイルであるH3と特異的に結合し、Sly1が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が結合するとき、互いに競合しないことが分かった。また、H1 + H2とH3が結合し、この結合がSly1によって阻害されることから、Sly1はSed5の分子構造を制御している可能性が示唆された。

第2章では、温度感受性Sly1変異蛋白質を用いた機能解析の結果が述べられている。Sly1蛋白質の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37℃でER-ゴルジ体間小胞輸送が停止する。この変異Sly1^{ts}蛋白質は、免疫共沈実験で、Sed5とほとんど結合しなかったが、野生型Sly1と同じくらいの量が膜画分に回収された。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。一方、Sly1^{ts}変異とSNARE複合体を解離させるATPase NSFの変異である*sec18^{ts}*は合成致死となること、Sec18へのHAタグの付与でも*sly1^{ts}*株内では生育阻害をおこすことを認めた。これは、Sly1がSNARE複合体の解離・再結合反応の近くで働いていることを示唆している。HA-Bet1標識小胞と*myc*-Sed5標識小胞の融合、即ちBet1-Sed5 SNARE複合体形成を調べる無細胞系を構築した。この系は、大腸菌で調製した野生型Sly1蛋白質の添加により促進された。これはSly1がSNARE複合体形成促進活性を持つことを意味する。

第3章では、先の*sly1^{ts}*温度感受性変異を多コピーで抑制する遺伝子の探索結果が述べられている。取得された多コピーサプレッサー遺伝子は、9種類で、5つのグループに分類することができた。特徴的な

ものとして、vSNAREである *BET1* と小胞体ーゴルジ体間輸送の促進因子である *USO1*、細胞壁のストレスセンサーと推定されている *WSC1*, *WSC2*, *MID2*がある。これまで機能不明のORFであった *HSS1* 遺伝子がサプレッサーとして取得されたので、詳細に検討した。この遺伝子が多コピーであると、*sly1^{ts}* 株で非許容温度でも小胞輸送が回復することを確認した。遠心分画及び間接免疫蛍光染色により Hss1 は ER に局在する膜貫通型蛋白質であることが分かった。電子顕微鏡観察では、このとき ER 膜系が細胞内で発達することが認められた。この ER 膜系の変化が、変異抑制に関与していると予想される。

以上、本論文は、酵母を材料に ER からゴルジ体への小胞輸送に関わる Sed5 および Sly1 蛋白質の分子レベルの特徴と機能を解明し、更に新規な遺伝子 *HSS1* の関与を明らかにした。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、審査委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。