

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏名 阿部 将人
指導教官名 依田 幸司

論文題目

出芽酵母における糖ヌクレオチドトランスポーターの細胞内局在性に関する研究

リボソームで合成された分泌性の蛋白質が小胞体膜を通過し、ゴルジ体を経て、細胞外に放出される一連の細胞内輸送において、ゴルジ体は運ばれてきた蛋白質前駆体に対する糖鎖修飾と行先の仕分けを行うオルガネラである。糖鎖の成分は細胞質内で糖ヌクレオチドとして合成され、ゴルジ体膜のトランスポーターによってゴルジ体内腔に取り込まれる。出芽酵母ゴルジ体でおこる糖鎖付加修飾がマンノースのみであるのに対し、動物細胞では複数の糖により複雑な糖鎖修飾がなされ、その糖の種類に応じてトランスポーターが存在する。それらは複数回膜貫通型の NSTs(Nucleotide Sugar Transporter(s))ファミリーを形成している。しかし、NSTファミリー蛋白質の詳細な分子構造や機能の機構などはまだ明かになっておらず、また、分泌性蛋白質が輸送経路に従ってオルガネラを通過していくのに対し、糖鎖付加に関わる蛋白質群はどのようにその流れに逆らってゴルジ体に局在するのか等、不明な点は多く残されている。

近年、酵母を用いた細胞内輸送機構に関する研究は盛んに行われ、細胞内の輸送経路や、輸送を行う小胞を形成する蛋白質構成、分子メカニズム等はかなり明らかになってきている。また酵母は、各種変異体を用いた解析が容易で、宿主ベクター系も確立し、ゴルジ体を中心とした細胞内輸送機構の研究を行う場合のモデル生物として非常に有効な実験材料である。

以上をふまえ、細胞内輸送機構とゴルジ体機能型蛋白質の局在機構について、酵母と動物細胞に共通のメカニズムを見出し、ゴルジ体機能がどのように制御されているかを明らかにすることを目的として研究を行った。

1 GDP マンノーストランスポーターのゴルジ体局在化機構

1-1. Vig4 蛋白質の発見

以前に当研究室の橋本らにより行なわれたバナジン酸耐性変異株の解析で見い出された *vig4* 変異株は、インペルターゼに付加される N 型糖鎖、及びキチナーゼに付加される O 型の糖鎖、どちらも欠損型を示した。変異型を相補する遺伝子をクローニングして解析したところ、325 アミノ酸からなる複数回膜貫通型の蛋白質をコードするものであった。ホモロジー検索から、*Leishmania donovani* の Lpg2 と相同性が高いことが示された。Lpg2 は GDP-マンノースを細胞質中からゴルジ体内腔にとりこむトランスポーターとして機能していることが明らかにされ、Vig4 蛋白質も同様の機能を有していることが予想された。マンノースは出芽酵母外糖鎖の主要構成成分であり、Vig4 蛋白質の変異によりゴルジ体内腔に取り込まれるマンノースの量が減少した為に外糖鎖付加機構に障害が生じたものと考えられた。本研究の遂行中に Dean らのグループによって実際にその活性が示された。

1-2. Vig4 蛋白質ホモログ、Yer039 の解析

酵母ゲノムプロジェクトにより見い出された Yer039c は Vig4 とアミノ酸配列上 89% に達する高い相同性があり、機能上の関わりがあることが予想された。しかし、遺伝子破壊を行っても Vig4 変異株でみられるような糖鎖付加欠損、薬剤感受性等の変異形質は見られなかった。RNA のノーザンブロットングによる結果などから、YER039c は通常発現していない偽遺伝子であると結論した。

1-3. Vig4 蛋白質の存在様式

プラスミド上から myc タグを付加した Vig4 蛋白質を野生型酵母内で発現して間接免疫蛍光抗体染色を行ったところ、細胞内にドット状の局在パターンを示しゴルジ体に局在することが推定された。

トランスポーター蛋白質の幾つかは複合体を形成して機能することが知られている。そこで、Vig4-HA と Vig4-myc のそれぞれ異なる tag を付加した 2 つの蛋白質をプラスミド上から共発現させた。酵母のライセートを調製し、CHAPS で膜を可溶化してから免疫沈降を行った。myc 抗体による免疫沈降後、HA 抗体により蛋白を検出したところ Vig4-HA のバンドが検出されたことからホモオリゴマーを形成していることがわかった。

スクリーニングより獲得していた変異遺伝子 *vig4-1*、*vig4-2* の全 DNA 配列を決定し変異点を特定した。Vig4-1 では 286 番目のアラニンがバリンに、Vig4-2 では 278 番目のセリンが

システインに置換されていた。この変異型 Vig4 もホモオリゴマーの形成能は野生型のもので変わらなかった。この変異点の近傍のアミノ酸配列は親水性に富んだ配列が並び、他の NSTs ファミリーに保存されていた。

これらのことから、Vig4 はホモオリゴマーを形成してゴルジ体に局在し、機能には C 末端側の親水性保存領域が重要な役割を果たすことがわかった。

1-4. Vig4 蛋白質の細胞内動態

C 末端側からアミノ酸を順次欠失した変異型蛋白質のシリーズを構築し、解析を行った。機能に重要な前述の領域を保ったままでも、膜貫通領域をわずかでも欠失すると小胞体からゴルジ体への輸送活性は失われ、小胞体に局在していた。一方で、細胞質側に突出している C 末端領域を削除すると蛋白質の安定性は若干減少し機能は消失するものの、ゴルジ体と液胞に局在していた。このことからゴルジ体への輸送には膜貫通領域が正常に保たれていることが必要であることが解った。

次にゴルジ体に到達後の Vig4 の細胞内動態をしらべる為に、輸送に関わる遺伝子の温度感受性変異株を利用した。細胞内の膜融合過程に関わる ATPase をコードしている *sec18^{ts}* 温度感受性株で Vig4 を発現させ、非許容温度条件下に晒すと通常のゴルジ体のドットは消失し、ゴルジ体がさらに微小に小胞化していると考えられた。次に小胞体からゴルジ体へ向かう輸送小胞の COPII コートサブユニットをコードしている *sec23^{ts}* 温度感受性株では、Anp1 や Van1 等のゴルジ体で機能する糖転移酵素が *sec18^{ts}* 株で見られたような細胞内分布を示したのに対し、Vig4 は小胞体に局在した。このことから Vig4 はゴルジ体から小胞体に向かう COPI 小胞にも取り込まれる可能性が考えられ、詳細に解析した。

細胞質側に突出した C 末端の 12 アミノ酸は電荷に富んだアミノ酸が並んでいて、COPI 小胞の認識に必要なシグナルではないかと考えた。そこで、野生型と C 末端を欠失した変異型 Vig4 を myc でタグgingし、CHAPS で可溶化した後で、myc に対する抗体で免疫沈降後、逆行輸送小胞のコートマーの Ret2(δ -COP)に対する抗体でウエスタンブロッティングを行った。野生型の Vig4 と Ret2 が共沈したのに対し、変異型の Vig4 と Ret2 は共沈しなかった。次に最 C 末端ペプチドを GST に連結して大腸菌で精製し、酵母ライセートを用いて pull-down アッセイを行ったところ、Ret2 が結合した。この結果をもとに各種変異型ペプチドを作り、さらに詳細に解析したところ、リジンに富んだ領域が特に重要なことがわかった。生細胞内でも変異型 C 末端配列をもつ Vig4 はゴルジ体局在性が低下し、多くが液胞に局在した。その他、COPI 小胞のコートマー(γ -COP)をコードしている *sec21^{ts}* に野生型 Vig4 を発現させて非許容温度条件下に晒すことによって逆行輸送経路を止めた場合は、ほとんどの Vig4 が液胞へと局在していた。また、COPI コートマーと結合することがわかっている Wbpl と Vig4 の C 末端配列を置き換え、野生株で発現させた場合は、ゴルジ体への局在性が変わらなかった。以上の結果から、Vig4 蛋白質は細胞質側に突出している C 末端の配列により COPI 小胞に取り込まれ、小胞体とゴルジ体間をリサイクルすると結論した。

動物細胞で単離されている NSTs ファミリーに属する蛋白質はゴルジ体の他に小胞体に局在しているものもあることがわかっていたがその局在メカニズムはよくわかっていなかった。NSTs ファミリーの C 末端領域は全て、親水性に富むアミノ酸が並んでいる。今回 Vig4 の実験により明らかになった知見を基に C 末端領域の配列を比較した。種による例外が若干あるものの、GDP-fucose transporter、UDP-galactose transporter、UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine dual transporter、GDP-mannose transporter 等ではリジンに富む配列がよく保存されていた。このことから、本研究によって明らかになった細胞内局在機構は広く保存されている可能性が考えられる。

2. Vig4 高発現株の解析

ゴルジ体の機能上、重要な役割を果たす NSTs ファミリーがゴルジ体の構造維持機構にも関わっている可能性が以前より指摘されていた。

VIG4 遺伝子のプロモーターは細胞周期の制御を受ける。このプロモーターを解糖系の GAPDH 遺伝子 TDH3 プロモーターとゲノム上で置き換え定常的に発現させて電子顕微鏡により観察したところ、動物細胞でみられる、輸送小胞の集積の場である VTCs (vesicular tubular clusters) と類似した構造体が見られた。さらに、TDH3 プロモーター制御の下、マルチコピープラスミドで野生株に導入し、さらに発現量を増やすと、複数の膜がスタックした動物細胞ゴルジ体で見られるような構造体が現われた。このことから、出芽酵母には動物細胞と同様のゴルジ体形成維持機構があると同時に Vig4 がそれに関わっている可能性が示唆された。

この構造体は間接免疫抗体染色により蛍光顕微鏡で観察すると、細胞内に特徴的なロッドとして検出できた。このロッドを指標に詳細に解析したところ、Vig4-1 や C 末端を欠失した Vig4 Δ 12 などの変異型の Vig4 蛋白質を高発現した場合ではロッドは見られなかった。ゴルジ体のスタック現象は Vig4 の機能、局在性、発現量が十分量に達しないと現れず、ゴルジ体の機能と構造には密接な関係があることが考えられた。