

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 阿部 将人

真核細胞は膜系を発達させて細胞内を分割し、各コンパートメントが独自の役割を果たすことにより、高度な生命活動を可能にしている。ゴルジ体は、タンパク質や脂質の修飾・成熟化や行き先の仕分けを行うオルガネラで、糖修飾はその重要な機能であるが、基質の糖ヌクレオチドは細胞質で合成されゴルジ体膜を越えて中に輸送されることが必須である。本論文は、酵母を材料に、この糖ヌクレオチド輸送体膜タンパク質 Vig4 の詳細な分子構造やゴルジ体局在化機構について調べた結果をまとめたもので、VII部からなる。

「I. 序論」では、出芽酵母におけるタンパク質の糖修飾やオルガネラ間の小胞輸送機構などの知見がまとめられており、「II. 実験材料」「III. 実験方法」に続く「IV. 結果」に、申請者の研究成果が記されている。

酵母ゲノムには Vig4 とアミノ酸配列上 89% の高い相同性をもつ Yer039c があり、機能上の関わりが予想された。しかし、この遺伝子を破壊しても *vig4* 変異株でみられるような糖鎖付加欠損や薬剤感受性は見られなかった。RNA のノーザンブロット解析結果などから、*YER039c* は通常発現していない偽遺伝子であると結論した。

*myc* タグを付加した Vig4 タンパク質を間接免疫蛍光抗体染色したところ、細胞内にドット状パターンとなりゴルジ体への局在が示された。異なるタグをもつ Vig4-HA と Vig4-*myc* を共発現させ、膜を可溶化して免疫沈降すると、抗 *myc* 抗体沈降物に Vig4-HA が検出され、ホモオリゴマーを形成していることがわかった。変異遺伝子 *vig4-1*、*vig4-2* の全塩基配列を決定し、Vig4-1 は 286 番目のアラニンがバリンに、Vig4-2 は 278 番目のセリンがシステインに置換されていることを明らかにした。これらもホモオリゴマーを形成した。変異点の近傍は親水性アミノ酸が並び、配列が他の糖ヌクレオチドトランスポーターにも保存されていることから、機能にはこの領域が重要と考えられる。

C 末端側からアミノ酸を順次欠失させたところ、膜貫通領域をわずかでも欠失すると Vig4 はゴルジ体へ輸送されず、小胞体に局在した。即ち、ゴルジ体への輸送に膜貫通領域が必須である。ゴルジ体における動態を調べるため、輸送の温度感受性変異株を利用した。膜融合に関わる *sec18<sup>ts</sup>* 株の非許容温度下では、Vig4 のゴルジ体ドットは消失し、さらに微小な小胞に存在した。小胞体からゴルジ体への輸送の *sec23<sup>ts</sup>* 株では、Vig4 は小胞体に局在した。一方、ゴルジ体から小胞体に向かう COPI 小胞輸送の *sec21<sup>ts</sup>* 株では、ほとんどの Vig4 が液胞に局在した。即ち Vig4 は COPI 小胞に取り込まれ小胞体に逆行輸送されると考えられた。

膜を可溶化し *myc*-Vig4 を免疫沈降すると、COPI コートの Ret2 ( $\delta$ -COP) が共沈した。細胞質に露出した C 末端の 12 アミノ酸は陽荷電アミノ酸が並ぶ。ここを欠失した Vig4 は Ret2

を共沈しなかった。C 末端ペプチドと GST の融合タンパク質で酵母ライセートから pull-down を行うと、Ret2 が結合してきた。各種変異型ペプチドで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。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。しかし、COPI 小胞により輸送される WbpI の C 末端配列を Vig4 欠失体に付けると、ゴルジ体への局在性が回復した。以上の結果から、Vig4 タンパク質は C 末端配列依存で COPI 小胞に取り込まれ、小胞体とゴルジ体間をリサイクルしていると結論した。

*VIG4* 遺伝子のプロモーターを強力な *TDH3* プロモーターとゲノム上で置き換え定常的に高発現させて電子顕微鏡により観察したところ、小胞や管が集積した構造体が見られた。さらに、マルチコピープラスミドで生産量を増やすと、複数の膜層盤が重層した哺乳類ゴルジ体のような構造体が見られた。出芽酵母にもこのような構造体形成機構があるとともに Vig4 がそれに関わる可能性が示唆された。この構造体は間接免疫抗体染色で観察すると、細胞内の特徴的なロッドとして検出できた。このロッドは Vig4-1 や C 末端欠失体などの変異型タンパク質の高生産では見られず、ゴルジ体の機能と構造にも密接な関係があると考えられた。結果に続いて「V. 考察」「VI. 今後の展望」「VII. 参考文献」が記されている。

以上、本論文は、酵母ゴルジ体の Vig4 タンパク質について詳細に調べ、オルガネラ膜タンパク質の機能と局在について重要な新知見を明らかにしたものであり、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。