

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 12 年度博士課程進学

氏 名 竹若 剛志

指導教官名 太田 明德

## 論文題目

酵母における小胞体膜タンパク質過剰生産による小胞体の増殖と  
それに伴う細胞応答に関する研究

アルカン資化性酵母 *Candida maltosa* は *n*-アルカンを唯一の炭素源とした培地で生育することが知られている。この際、アルカンの初発酸化に関与する小胞体膜タンパク質チトクローム P450 (以下 P450ALKs) の発現量が増大し、同時にチューブ状の小胞体様膜構造体が増殖することが確認されている。この P450ALKs のうち、*C. maltosa* がアルカン資化時に最も多量に生産することが知られている P450ALK1 を *Saccharomyces cerevisiae* において人為的に高生産させると、アルカン資化時の *C. maltosa* 同様チューブ状の小胞体様膜構造体が増殖する。同様の現象は同じく小胞体膜タンパク質である HMG-CoA レダクターゼやチトクローム  $b_5$  の高生産においても認められている。このような膜タンパク質に高生産による膜構造体の増殖は酵母だけでなく、フェノバルビタール等の薬剤処理を施した動物肝細胞等や、さらには内膜系を持たないはずの大腸菌においても認められている。このように広く認められる現象にもかかわらず、この様な膜構造体の発達するしくみに関する知見は極めて乏しいのが現状である。そこで、この現象に関与する細胞内因子を同定、解析することでこの現象の分子機構を明らかにすることを目指して研究を行った。

### 1. Ire1p の関与

*S. cerevisiae* において *GALI* プロモーターを用いて P450ALK1 を人為的に高生産させると小胞体様膜構造体が増殖することは、リン脂質リン量の増加、小胞体を染色する蛍光物質 DiOC<sub>6</sub> の蛍光強度の上昇、抗 Pdi1p 抗体を用いた間接蛍光抗体法及び電子顕微鏡写よる

形態学的観察によって確認した。抗 Pdi1p 抗体を用いた間接蛍光抗体法による観察の結果より、P450ALK1 高生産に伴って小胞体内腔シャペロンタンパク質である Pdi1p が増加することが考えられたことから、*PDII* について同じく小胞体内腔シャペロンタンパク質遺伝子である *KAR2* とともにノーザン解析を行ったところ、これらの mRNA 量が上昇することが確認された。これらの遺伝子の発現は小胞体膜タンパク質である Ire1p によって制御されていることが知られていることから、*IRE1* 遺伝子を破壊した株を作成し、P450ALK1 の生産量を検討した。その結果、この *IRE1* 破壊株においては P450ALK1 生産量が野生株と比較して大幅に低下することが認められた。しかしながらこの遺伝子の関与は使用した株に特異的であり、EUROSCARF により作成された遺伝背景の異なる *IRE1* 破壊株では P450ALK1 生産への関与は認められなかった。四分子解析の結果より、この Ire1p 依存性には複数の遺伝子が関与しているが示唆された。

## 2. $\text{Ca}^{2+}$ イオンの影響

動物細胞においてウイルスタンパク質が小胞体膜に蓄積することで引き起こされる ER オーバーロードといわれる現象においては  $\text{Ca}^{2+}$ イオンが重要な働きをすることが知られていることから、P450 高生産への  $\text{Ca}^{2+}$ イオンの関与を検討した。この為、最終的に通常 1.7mM の  $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度が 0.8  $\mu\text{M}$  まで低下し、等モル分の  $\text{Mg}^{2+}$ イオンを添加しているため、二価のカチオン濃度は通常の培地と同様な培地を作成した。この  $\text{Ca}^{2+}$ 微量培地における P450ALK1 生産量は  $\text{Ca}^{2+}$ 通常培地における生産量の約 20%にまで低下することが認められた。 $\text{Ca}^{2+}$ 通常培地にカルモジュリンアンタゴニストとして知られているクロルプロマジン を添加しても同様に P450ALK1 生産量が溶媒添加株の約 30%にまで低下することから、 $\text{Ca}^{2+}$ イオンは直接作用しているわけではなく、カルモジュリンと結合してその作用を発揮していると考えられる。

カルモジュリンが結合することが知られているタンパク質のうち、転写因子である HAP 複合体の構成タンパク質遺伝子である *HAP5* 破壊株では野生株の約 30%に、カルモジュリンと結合する Sap4p と結合することで間接的にカルモジュリンの影響を受けると考えられるタンパク質脱リン酸化酵素遺伝子である *SIT4* 破壊株では野生株の約 20%に P450ALK1 生産量が低下した。HAP 複合体はヘム合成に関わる酵素の遺伝子の転写にも関与することから、これらの破壊株ではヘム合成系に影響を及ぼすことで間接的に機能的な P450ALK1 の生産が低下している可能性が考えられた。ヘム前駆体である 5-アミノレブリン酸を添加すると、この物質の合成以降の段階でヘム合成に関与する *HAP5* の破壊株における

における P450ALK1 生産量は回復しなかったものの、ヘム合成系への関与が現在のところ知られていない *SIT4* の破壊株における P450ALK1 生産量は野生株の 70%にまで回復することが認められた。Ca<sup>2+</sup>微量培地における P450ALK1 生産量の低下は *HAP5* 破壊株の場合と同様 5-アミノレブリン酸添加により回復しなかった。このことから、Ca<sup>2+</sup>微量培地における P450ALK1 生産量の低下は HAP 複合体の機能が低下していることが一因であると考えられる。

### 3. シャペロンタンパク質の関与

P450ALK1 高生産に伴い局在の異なるタンパク質や発現量の異なる遺伝子が存在すれば、それらの解析を通じて P450ALK1 高生産に伴う小胞体様構造体の発達という現象を解明する糸口が得られるものと期待できる。そこで、まず、二次元電気泳動によりタンパク質を分離することで、P450ALK1 生産に伴い局在が変化する或いは量が変化するタンパク質を取得することにした。細胞抽出液を 100,000×g の上清とペレットとに分画し、各々を二次元電気泳動にて解析した結果、上清画分に P450ALK1 高生産の場合は消失するタンパク質が存在し、N 末のアミノ酸を解読したところ、HSP90 ファミリーに属するシャペロンタンパク質 Hsc82p であることが判明した。しかしながら、*HSC82* 及びこれと高い相同性を有する *HSP82* 遺伝子破壊株における P450ALK1 生産量は野生株と比較して差は認められず、P450 発現に直接関与していないと考えられる。

次に、cDNA サブトラクション法により P450ALK1 生産に伴い発現量に差が生じる遺伝子を取得した結果、P450 高発現により発現量が上昇する遺伝子の一つとして、HSP70 ファミリーに属するシャペロンタンパク質遺伝子 *SSE1* が取得された。*SSE1* 破壊株における P450ALK1 生産量は野生株の約 40%に低下した。*Sse1p* はカルモジュリンとタンパク質キナーゼの PKA のシャペロンとして機能することが知られており、カルモジュリンの P450ALK1 生産への関与は既に検討したので、PKA の関与について解析した。PKA の触媒サブユニットをコードする遺伝子 *TPK1*、*TPK2*、*TPK3*、及び活性化シグナル物質である cAMP を分解する酵素 *Pde2p* をコードする遺伝子 *PDE2* についての各破壊株における P450ALK1 生産量は野生株との差が認められなかったことから、PKA は P450ALK1 の生産に関与していないのではないかと考えられた。*SSE1* 破壊株でノーザン解析を行い P450ALK1 遺伝子の mRNA 量を検討したところ、野生株の 5%にまで減少していた。このことから、*Sse1p* は P450 遺伝子の発現あるいはその mRNA の安定性に関与していると考えられる。

#### 4. 小胞体膜タンパク質の関与

小胞体膜タンパク質である P450ALK1 が増加している、という情報は同じく小胞体膜に局在しているタンパク質に伝わる可能性が高いと考えられる。そこで、機能不明な小胞体膜タンパク質の P450ALK1 高生産への関与を検討することにした。まず、Ca<sup>2+</sup>イオンが必要であったとの結果をふまえ、カルシウム結合性シャペロンタンパク質であるカルネキシンと相同性が認められるが酵母においては機能が解析されていない Cne1p をコードする遺伝子の破壊株における P450ALK1 生産量を検討した。その結果、野生株との間に差は認められなかった。次に、動物細胞において分泌タンパク質の品質管理に関与しているとされる BAP29 と相同性が認められるが機能不明なタンパク質をコードする *YET1* 遺伝子の破壊株における P450ALK1 生産量を検討した。その結果、野生株の約 50% にまで低下した。*YET1* には *YMR040W* と *YDL072C* の二つのホモログが存在し、*YMR040W* 破壊株における P450ALK1 生産量は野生株の約 80% に低下し、*YDL072C* 破壊株では野生株と同程度であった。*YET1* と *YMR040W* の二重破壊株における P450ALK1 生産量は野生株の約 40% と *YET1* 破壊株より若干ではあるがさらに低下した。しかしながら、*YET1* と *YDL072C* の二重破壊株ではさらなる P450ALK1 の生産の低下は認められなかったことから、P450ALK1 高生産には、Ydl072Cp は関わっていないと考えられる。*YET1* と *YMR040W* の二重破壊株ではミクロソーム画分に含まれるリン脂質リン量が増加しないこと及び DiOC<sub>6</sub> 染色による蛍光強度が上昇しないことから、小胞体様膜構造体の発達もないと考えられた。この現象はリン脂質前駆体であるイノシトール、コリン及びエタノールアミンの添加により完全に相補されることから、この破壊株においては P450ALK1 高生産に対応する膜リン脂質の供給に欠陥があるものと考えられる。

#### まとめ

本研究において、小胞体膜タンパク質 P450ALK1 高生産に伴う小胞体様膜構造体の発達に必要な幾つかの因子を見い出した。機能未知な Yet1p がリン脂質合成と関連している可能性が高いことから、このタンパク質をさらに解析していくことで上記現象の分子機構が明らかとなることが期待される。