

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 13 年度博士課程進学

氏名 稲留 弘乃

指導教官 依田 幸司

論文題目

サブコンパートメントのプロテオーム解析によるゴルジ体膜タンパク質の研究

はじめに

真核細胞は細胞内に様々なオルガネラを発達させることによって細胞をいくつもの区画に仕切り、細胞が担う役割を積極的に分業させて複雑な細胞機能の効率を高めている。これらのオルガネラがそれぞれ固有の機能を発揮するためには、タンパク質をはじめとする構成分子が正確に局在しなければならない。新たに合成されたタンパク質が直接移行できるオルガネラは小胞体、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、そして葉緑体のみで、それ以外のゴルジ体、エンドソーム、リソソームといったオルガネラと、細胞膜、細胞外へ運ばれるタンパク質は、全て小胞体でその内側もしくは膜に挿入され、小胞輸送により運ばれる。ゴルジ体はこの小胞輸送系の中心に位置するオルガネラで、タンパク質の翻訳後修飾や最終目的地への仕分けを行っている。

ゴルジ体にはいくつかのサブコンパートメントが存在する。その構成分子は小胞輸送により極めて流動的に入れ替わるが、定常状態では各サブコンパートメントで一定の局在量が維持されている。あるタンパク質がゴルジ体のどのサブコンパートメントに局在するか、という個々のタンパク質の局在はよく調べられているが、逆に、おのおののサブコンパートメントが主にどのようなタンパク質から構成されているのかは、ゴルジ体の機能を知る上で非常に重要であるにも関わらずあまり調べられていない。本研究ではゴルジ体サブコンパートメント間の機能の違いを、局在タンパク質の網羅的な同定を通して理解することを目的とした。

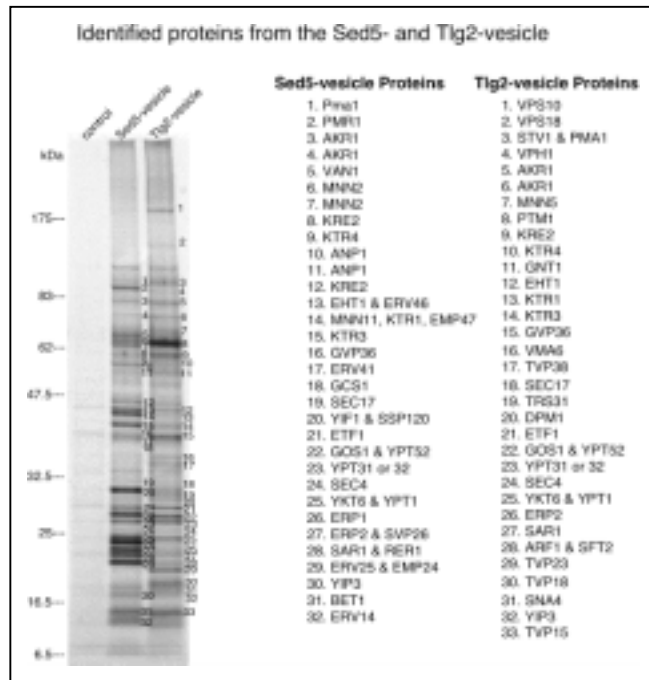
1. ゴルジ体サブコンパートメントの単離法の確立

始めに、出芽酵母をモデル細胞として、ゴルジ体のサブコンパートメントである early Golgi と late Golgi を分離・精製する方法の開発を行った。early Golgi と late Golgi を分取する方法として、ショ糖密度勾配遠心分画法が確立されているが、タンパク質の同定に足る量のサンプルを高純度で単離することは困難である。本研究では標的とするオルガネラに特異的に局在するタンパク質をプローブとして、免疫学的に単離する方法を用いた。分泌経路上のオルガネラには、それぞれ異なる syntaxin family に属する t-SNARE が局在し、輸送小胞のターゲットという機能のためにその局在は厳密に制御されている。そこで、early Golgi に局在する Sed5 と late Golgi、early endosome 間をリサイクルしている Tlg2 の各 t-SNARE の細胞質領域に myc を tagging し、それをモノクローナル抗体を介してビーズに吸着させて、early Golgi と late Golgi、early endosome を単離した。

この方法で単離した画分に目的とするゴルジ体サブコンパートメントが回収されていることを、マーカータンパク質の検出により確認した。Sed5 をプローブとして単離した Sed5 小胞には小胞体-ゴルジ体間をリサイクルしている v-SNARE である Sec22 や、early Golgi に局在する糖転移酵素のサブユニットである Mnn9 が回収された。一方、ゴルジ体から液胞への輸送小胞の v-SNARE である Vti1 や late Golgi のプロテアーゼである Kex2 はほとんど回収されなかった。逆に Tlg2 をプローブとして単離した Tlg2 小胞には Vti1 や Kex2 が濃縮され、Sec22 や Mnn9 はほとんど回収されなかった。このことから、Sed5 小胞には early Golgi が、Tlg2 小胞には late Golgi が回収されていることが解った。

2. ゴルジ体サブコンパートメントのプロテオーム解析

次に、単離した小胞に局在するタンパク質の網羅的な同定を行った。単離した小胞を2次元電気泳動で分離し、peptide mass fingerprintingにより Sed5 小胞から 33 個、Tlg2 小胞から 57 個のタンパク質を同定した。しかし、同定されたタンパク質は Heat shock protein や細胞骨格系のタンパク質など、細胞質のタンパク質が多く、ゴルジ体に局在することが知られているタンパク質は少数しか同定されなかった。また、1次元の SDS-PAGE に比べて、2次元電気泳動では両画分間のタンパク質プロファイルの違いが少なくなっていた。この原因は、2次元電気泳動は膜貫通領域を持つ疎水性の強いタンパク質の分離に適さないために、ゴルジ体に多く存在する膜タンパク質がスポットとして検出できなかったためと考えられた。そこで、2次元電気泳動で検出できなかった膜タンパク質を同定するために TritonX-114 のフェーズセパレーションにより、膜タンパク質と可溶性タンパク質を分離し、界面活性剤層に回収されたタンパク質を網羅的に同定した。Sed5 小胞から検出された 32 のバンドから 38 のタンパク質を、Tlg2 小胞から検出された 33 のバンドから 33 のタンパク質を同定した。その結果、Sed5 小胞からは小胞体-ゴルジ体間の輸送小胞である COPII の構成タンパク質や、糖鎖修飾の初期に働く糖転移酵素などが同定された。Tlg2 小胞からは液胞へのタンパク質の仕分けを行う Vps10 や Vps18, late Golgi の酸性化を担う V-ATPase のサブユニット Stv1、Vma6 などが同定された。また、medial Golgi に局在する糖転移酵素は Sed5 小胞、Tlg2 小胞の両方から同定された。この結果は報告されている局在と一致することから、同定されたタンパク質からもゴルジ体サブコンパートメントが非常に精度良く単離できていることが解った。



The proteins found in the Sed5- and Tlg2-vesicles

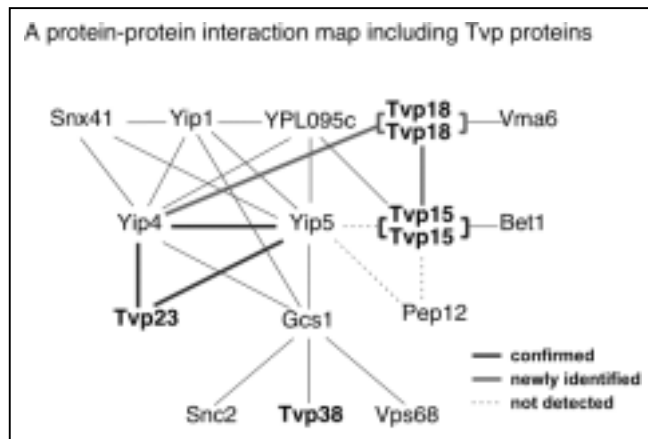
	GDP & transport	mannosyl-transferase	vesicle transport	small GTPase	others	vacuole alkaline
Sed5 vesicles	Emp24 Erp29 Eip1 Emp47 Erp46 Erp41 Erp14	Arg1 Mns2 Mns10 Mns11 Van1	Gcs1 Bet1 Rer1 Yft1	Sar1 Sec4 Ypt1 Yp431 or 32	Pnc1	Ssp26 SSP120
Sed5 and Tlg2 vesicles	Erp2	Kre2 Ker1 Ker3 Ker4	Erp1 Gcs1 Sec17 Ypt1 Yps8 Yps3	Sar1 Sec4 Ypt1 Yp431 or 32 Yp52	Akr1 Eht1	Gvp36
Tlg2 vesicles		Mns5	Tss31 Vps15 Vps18	Arf1	Dpm1 Gnt1 Stv1 Vma6	Tvp15 Tvp18 Tvp23 Tvp38 Pnc1 Sna4

ンパク質を分離し、界面活性剤層に回収されたタンパク質を網羅的に同定した。Sed5 小胞から検出された 32 のバンドから 38 のタンパク質を、Tlg2 小胞から検出された 33 のバンドから 33 のタンパク質を同定した。その結果、Sed5 小胞からは小胞体-ゴルジ体間の輸送小胞である COPII の構成タンパク質や、糖鎖修飾の初期に働く糖転移酵素などが同定された。Tlg2 小胞からは液胞へのタンパク質の仕分けを行う Vps10 や Vps18, late Golgi の酸性化を担う V-ATPase のサブユニット Stv1、Vma6 などが同定された。また、medial Golgi に局在する糖転移酵素は Sed5 小胞、Tlg2 小胞の両方から同定された。この結果は報告されている局在と一致することから、同定されたタンパク質からもゴルジ体サブコンパートメントが非常に精度良く単離できていることが解った。

3.新規ゴルジ体タンパク質の解析

また、機能・局在が分かっていないタンパク質が Sed5 小胞から 2 個、Tlg2 小胞から 6 個、両方の画分から 1 個同定された。このうち、これまでに全く解析されていない ORF にコードされるタンパク質について解析を行った。Sed5 小胞から同定された YHR181w にコードされるタンパク質を Svp26(Sed5-Vesicle

Protein of 26kDa)、Tlg2 小胞から同定された YKR088c、YDR084c、YMR071c、YDR100w にコードされるタンパク質をそれぞれ Tvp38, 23, 18, 15(Tlg2-Vesicle Protein of 38, 23, 18, 15kDa)、両画分から同定された YIL041w にコードされるタンパク質を Gvp36(Golgi-Vesicle Protein of 36kDa)と名付けた。Svp26, Tvp38, 23, 18 は高等真核生物に至るまでよく保存され



たタンパク質が存在し、Gvp36とTvp15は真菌類のみでhomologueが存在した。これら新規ゴルジ体タンパク質は全て生育に必須ではなく、遺伝子破壊株は野生株と同等な生育を示した。間接蛍光抗体染色で細胞内の局在を調べた結果、Svp26はearly Golgiに、Tvp38, 23, 18, 15はlate Golgi, early endosomeに、Gvp36は細胞質およびゴルジ体全体に局在することを明らかにした。

4. Tvp38, 23, 18, 15の解析

網羅的Two-Hybridのデータから、Tvpタンパク質4種は全て同一のinteraction map上に表されることが解った。このinteractionがin vivoの状態を反映しているか免疫沈降で調べた結果、Tvp23はYip1 familyに属するRab結合タンパク質であるYip4, Yip5と結合することが確認された。Tvp15とYip5は共沈しなかったが、Tvp15と共沈した。また、Tvp18はTvp18, Tvp15、および弱いながらもYip4と結合することが新たに明らかになった。このmapには他にも小胞輸送に関わるタンパク質が多く表されることから、Tvpタンパク質も小胞輸送に関わることが強く示唆された。しかし、遺伝子破壊株を用いた解析ではカルボキシペプチダーゼY(CPY)、アルカリホスファターゼ(ALP)の液胞への輸送効率、FM4-64を用いて調べたエンドサイトーシスの効率は野生株と変わらなかった。Tvpタンパク質は多くのlate Golgi, endosomeのタンパク質との相互作用により、late Golgi/endosome構造の足場を構成していると考えられる。

5. Svp26の解析

svp26破壊株は野生株と比べて若干の生育の遅れが見られ、ゴルジ体に局在するv-SNAREであるSft1とGos1の存在量が減少していた。CPY, ALPの輸送効率は野生株と差が見られなかった。免疫沈降により結合するタンパク質の検索を行った結果、Svp26はホモオリゴマーを形成することが解った。また、ゴルジ体に局在するmannosyltransferaseであるKtr3が微量ながら共沈した。svp26破壊株はktr3破壊株と同じくCalcofluor Whiteに感受性を示し、野生株ではゴルジ体に局在しているKtr3がsvp26破壊株では小胞体に蓄積していた。これらのことから、Svp26は特定の一群のタンパク質の輸送に関与していると考えられる。

まとめ

本研究ではゴルジ体サブコンパートメントを単離する方法を確立した。そのプロテオーム解析やマーカータンパク質の検出から極めて高い純度で膜画分が分離されていることを明らかにした。また、新規ゴルジ体タンパク質6種を同定し、局在と相互作用するタンパク質を同定した。Tvp タンパク質は post Golgiでの小胞輸送に関与するタンパク質ネットワークを形成していることが解った。Svp26は一群のタンパク質がゴルジ体に局在するために必要であることを明らかにした。