

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 稲留 弘乃

真核生物は細胞内に様々なオルガネラを分化させて細胞を仕切り、その担う役割を積極的に分業させて、複雑な細胞機能を果している。小胞体に始まる小胞輸送は、オルガネラや細胞質膜、細胞外にタンパク質や脂質を運ぶ必須の機構で、ゴルジ体はその要にあり、タンパク質の修飾や最終目的地への仕分けを行う。ゴルジ体は、組成や機能が異なるサブコンパートメントからなるが、その構成はあまり明らかでない。本論文は、酵母のゴルジ体サブコンパートメントを単離し、プロテオーム解析し、新規なタンパク質の発見とその機能解析までの研究成果をまとめたもので、3章からなっている。

第一章では、ゴルジ体サブコンパートメントの単離法の確立とプロテオーム解析について述べている。出芽酵母の 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 の細胞質領域を myc タグで標識した株を造成した。これを穏和に溶菌し、抗 myc モノクローン抗体で免疫吸着して、膜小胞を回収した。得られた画分に目的の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で確認した。単離した小胞のタンパク質を二次元電気泳動で分離し、Sed5 小胞から 33、Tlg2 小胞から 57 のタンパク質を同定した。しかし、二次元電気泳動法は膜貫通領域を持つ疎水性タンパク質の分離には適さず、膜タンパク質は少数しか検出されなかった。そこで、Triton X-114 による相分離法でタンパク質を分け、界面活性剤層の疎水性タンパク質を網羅的に調べ、Sed5 小胞から 38、Tlg2 小胞から 33 のタンパク質を同定した。Sed5 小胞から、小胞体由来輸送小胞 COPII の構成要素、前期糖鎖修飾の糖転移酵素、Ca<sup>2+</sup>輸送体 Pmr1 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、内部を酸性化する V-ATPase の Stv1、Vma6 などが同定された。後期糖転移酵素や低分子量 GTPase は両小胞から同定された。この結果はこれまで報告された局在と一致し、サブコンパートメントは非常に精度良く単離できている。

第二章では、新規ゴルジ体タンパク質の解析について述べている。機能・局在など未知のタンパク質が、Sed5 小胞に 2 つ、Tlg2 小胞に 6 つ、両方に 1 つ同定された。このうち、全く未解析の Svp26 (Sed5-Vesicle Protein of 26 kDa)、Tvp38, 23, 18, 15 (Tlg2-Vesicle Protein of 38, 23, 18, 15 kDa)、両画分にある Gvp36 (Golgi-Vesicle Protein of 36 kDa) について詳細に解析した。Svp26, Tvp38, 23, 18 は高等動植物まで広く存在しているが、単独の遺伝子破壊株は野生株と同等に生育した。間接蛍光抗体染色で、Svp26 は early Golgi に、Tvp38, 23, 18, 15 は late Golgi-early endosome に、Gvp36 は細胞質とゴルジ体全体に局在することを明らかにした。

網羅的 Two-Hybrid 解析から、Tvp タンパク質 4 種は、Ypt 結合タンパク質 Yip4, Yip5 を含む同じ相互作用ネットワーク内にあり、主な結合は免疫沈降でも確認した。ここには多くの小胞輸送関連タンパク質が含まれ、単独の遺伝子破壊では、カルボキシペプチダーゼ Y (CPY)やアルカリ性ホスファターゼ(ALP)の液胞への輸送効率、FM4-64 のエンドサイトシス効率も野生株と変わらなかったが、タンパク質間結合ネットワークの総体が late Golgi-early endosome の小胞輸送を助けている可能性が考えられる。

第三章では、Svp26 の解析について述べている。svp26破壊株では、ゴルジ体 v-SNARE の Sft1 と Gos1 の量が減少していたが、CPY, ALP の輸送効率は野生株と差がなかった。免疫沈降により、Svp26 がオリゴマーを形成し、ゴルジ体の糖転移酵素 Ktr3 と結合していることを発見した。svp26破壊株では Ktr3 が小胞体に誤って局在した。これらから、Svp26 は、Ktr3, Sft1,Gos1 など特定のタンパク質を early Golgi に局在させるための輸送に関わると考えられる。

以上、本論文は、酵母ゴルジ体のサブコンパートメントを構成するタンパク質について網羅的かつ詳細に調べ、ゴルジ体について多くの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。