

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 17 年度博士課程 入学
氏 名 荒井 斉祐
指導教員名 依田 幸司

論文題目 出芽酵母におけるゴルジ体インヘリタンスの分子機構

真核生物は、細胞分裂に伴いそのオルガネラを娘細胞に適切に引き継がせる。これは、細胞の生存に必須である。特に、出芽酵母の様な非対称な細胞質分裂を行う生物では、分配の遅れや不足は、娘細胞にとって不利であり子孫を残すという観点から好ましくない。逆に、娘細胞へのオルガネラの過剰な分配は、母細胞の分裂後の生育、生存にとってダメージとなる。オルガネラの分配は、母細胞から娘細胞へどもの運ぶだけの単純な過程ではなく、オルガネラの生合成、その構造、機能維持等のメカニズムと密接に関係しており極めて重要である。

出芽酵母において、基本的にオルガネラは、母細胞から娘細胞へ伸びたアクチンケーブルの上を走るミオシン分子により行われている事がよく知られている。液胞、ミトコンドリア、ペルオキシソームについては、各々の分配を担うクラス V ミオシンである Myo2 のレセプターが見いだされており、これらを正確に娘細胞へと分配するメカニズムの解析が比較的良く進んでいる。しかしながら、ゴルジ体の分配に関しては、上記のオルガネラと同様にアクチン-ミオシン系に依存している事が報告されているものの、その詳細な機構は不明である。

本研究は、まず、出芽時におけるゴルジ体の母細胞から娘細胞への分配においてミオシンとゴルジ体の結合を仲介する Myo2 レセプター候補分子を見だし、次いでその分子の詳細な機能解析を通じて、出芽酵母におけるゴルジ体インヘリタンスの分子機構を明らかにする事を目的とした。

1. ゴルジ体膜に局在する Ret2 と Ypt11 の結合

小胞体から出芽した COPII 小胞を early Golgi とドッキングする段階で機能する small GTPase で Ypt/Rab ファミリータンパク質に属する Ypt1 と、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を担う小胞を形成する COP I コート複合体の構成成分でありゴルジ体膜に局在する Ret2 が遺伝学的、物理的に相互作用する事、また、出芽酵母に存在する Ypt1 と相同性の高い他の Ypt/Rab ファミリータンパク質(Ypt6, 7, 10, 11, 31, 32, 51, 53, Sec4 の 9 種)と Ret2 の結合を検討した結果、Ypt11 と Ret2 の結合は、他の Ypt/Rab タンパク質との結合と比較して最も強い事が当研究室の過去の研究により示されていた。しかし、*Saccharomyces Genome Database* において *YPT11* の配列が修正され、従来の配列よりも 186 塩基上流から ORF が始まり、アミノ酸が 355 でなく 417 に増えたタンパク質が、細胞内で機能する本来の Ypt11 である可能性が高い事が示唆された。そこで本研究においては、まず、この N 末が延長した配列の Ypt11 もやはり Ret2 と強く結合するのかを確認し、また同時に、Ypt1 を含めた 10 種の Ypt/Rab タンパク質と Ret2 の結合についても比較検討した。GST 融合 Ypt/Rab タンパク質を大腸菌で大量発現させ、Glutathione-Sepharose beads を用いて精製し、Ret2-3HA を発現させた酵母サイトゾルを用いて GST pull-down assay により結合を検討した。その結果、再現性良く Ypt1, 6, 11, 32, Sec4 と Ret2 の結合が認められ、その中でもやはり Ypt11 と Ret2 の結合が他の Ypt/Rab タンパク質と Ret2 の結合に比べ顕著に強い事が確認された。また、myc タグでラベルした Ret2 と HA タグでラベルした Ypt11 を高発現させた酵母ライセートを用いて免疫沈降実験を行ったところ、両者は共沈する事が見いだされ、Ypt11 と Ret2 は *in vivo* においても結合している事が明らかとなった。

Ypt11 は、Myo2 と結合する事、また、その結合を通じてミトコンドリアの娘細胞への分配、retention に関与している事が東京大学理学部松井泰博士らにより報告されている。この事と、我々が見いだした Ypt11 とゴルジ体膜に局在している Ret2 が強く結合している事実を合わせて考え、Ypt11-Ret2 複合体がアクチン依存的なゴルジ体の娘細胞への分配を担う Myo2 レセプターとして機能しているのではないかと予想し以降の検討を行った。

2. Ypt11 の過剰発現、遺伝子欠損がゴルジ体の細胞内局在に及ぼす影響

もし、Ypt11-Ret2 複合体がゴルジ体の分配で機能しているのであれば、その欠損や結合を壊す事、また、その過剰発現はゴルジ体の局在に影響を及ぼすと考えられる。そこで、early Golgi と late Golgi に局在している Ret2, early Golgi に局在する Och1, late Golgi に局在する Sft2 を GFP あるいは HA タグでラベルし、その局在に対する *ypt11* の欠損や過剰発現の影響を蛍光顕微鏡により観察した。3 つのマーカータンパク質は、野生株と *ypt11* 遺伝子欠損株において母細胞及び、娘細胞にほぼ均等に典型的な酵母のゴルジ体ドットとして観察された。*GAL* プロモーターにより Ypt11 を過剰発現した細胞では、これらのマーカータンパク質が娘細胞へ偏って局在する

細胞が数多く観察された。それに対し、Myo2 との結合能が失われた Ypt11 変異体を過剰発現した細胞においては、全てのマーカートンパク質の娘細胞への集中は全く観察されなかった。次に、Ypt11 と Ret2 の結合が上記の娘細胞へのゴルジ体の過剰な移行に必要なかどうかを検討する為に、Error-prone PCR 法により *RET2* 全長にランダムに変異を導入し、Ypt11 との結合能が低下した *ret2* 温度感受性変異株の取得を試みた。その結果、Ypt11 との結合能が明らかに低下している *ret2* 温度感受性変異株を取得した。この *ret2* 温度感受性変異株において、Ret2 , Och1 , Sft2 の局在は野生株と比較して全く変化は見られなかった。しかしながら、この *ret2* 温度感受性変異株で Ypt11 を過剰発現したところ、野生株において Ypt11 を過剰発現した際に生じるゴルジ体の娘細胞への集中が全く観察されない事が分かった。また、Ypt11 を過剰発現した細胞では、ミトコンドリアの娘細胞へ集中と著しい生育阻害が生じる事が報告されている。*ret2* 温度感受性変異株において、Ypt11 の局在、アクチン染色像に異常は見られず、また、Ypt11 を過剰発現した際に生じるミトコンドリアの娘細胞への集中も観察された。しかしながら、*ret2* 温度感受性変異株では Ypt11 を過剰発現してもその生育に影響は全く生じなかった事から、Ypt11 過剰発現による生育阻害はゴルジ体の娘細胞への過剰な分配が原因であると考えられた。

次に、late Golgi に特異的に局在する表在性の膜タンパク質であり、late Golgi の非常に良いマーカートンパク質として頻繁に用いられている Sec7 の局在について検討した。同じ late Golgi マーカートンパク質である Sec7 が Sft2 と異なる点は、野生株において細胞周期の一時期に Sec7 は娘細胞に偏って局在する事である。Ypt11 を過剰発現した細胞では、この Sec7 が娘細胞へ偏って局在する割合は約 5% 上昇するのみで大きな変化は見られなかった。しかし、非常に興味深い事に、*ypt11* 遺伝子欠損株では Sec7 の娘細胞への偏った局在が完全に失われる事を見いだした。さらに、Myo2 との結合能が低下した *ypt11* 変異タンパク質を野生型タンパク質の代わりに発現する株、及び Ypt11 との結合能が低下した *ret2* 温度感受性変異株においても Sec7 の娘細胞への偏った局在が殆ど認められなかった。以上の実験結果より、Ypt11 が、おそらくは Myo2 と Ret2 との結合を仲介する分子として機能する事により、ゴルジ体の娘細胞へのインヘリタンスに関与している事が強く示唆された。

3. GFP でラベルした Sec7 の生細胞観察

Ypt11 がゴルジ体の娘細胞へのアクチン依存的なインヘリタンスに関与しているなら、それは母細胞から娘細胞へとゴルジ体を輸送する経路で働いているのか、運ばれたゴルジ体を娘細胞に繫留する過程で機能をしているのか、またはその両方なのかを明らかにする為に、野生株、及び *ypt11* 遺伝子欠損株における、Sec7-3xGFP で可視化した late Golgi の動きについて生細胞を用いたタイムラプス観察により比較検討した。その結果、野生株において、Sec7-3xGFP は母細胞から娘細胞へと極性を持った軌跡を示す細胞が観察された。それに対し、*ypt11* 遺伝子欠損株において、野生株とは異なり、多くの Sec7-3xGFP を持つゴルジ体槽は動きが殆ど無く停止した状態であった。

また、幾つかの Sec7 において動きが観察されたが、その動きはランダムであり母細胞から娘細胞へと極性をもった軌跡を描く Sec7 は全く観察されず、その移動速度も野生株と比較して明らかに早かった事から、アクチン非依存性的な動きである事が推測された。さらに、アクチン重合阻害剤 Lat-A で処理した細胞においては、*ypt11* 遺伝子欠損株における Sec7 と同様に殆ど停止した状態であった。次に、FLIP(fluorescence loss in photobleaching)を用いて Sec7 の動きを解析した。FLIP は、調べたい領域外の全細胞 1/4-1/2 程度をブリーチする操作を一定時間おきに繰り返す事によって、調べたい領域から mobile な分子が消失し、その結果、残った immobile な分子の蛍光量を測定する事が出来る手法である。本研究においては、Sec7 の蛍光量について調べたい領域を母細胞全体とし、母細胞から Sec7 が移動してくる娘細胞全体をブリーチング領域とした。上記のタイムラプス観察より、野生株では Sec7 は母細胞から娘細胞へと積極的に極性をもって運ばれているのに対し、*ypt11* 遺伝子欠損株と Lat-A 処理細胞では Sec7 は殆ど停止していた。この事から、おそらく野生株では母細胞における蛍光量の低下が、*ypt11* 遺伝子欠損株と Lat-A 処理細胞と比較して早くなるという結果が得られると予想した。娘細胞全体の蛍光を 1 秒間隔でブリーチし続け、母細胞中に残った Sec7-GFP の蛍光量を測定した結果、母細胞中の蛍光半減期を示す Half life の値が、野生株では 64.9(arbitrary unit), *ypt11* 遺伝子欠損株では 162.0, Lat-A 処理細胞では 151.0 と、予想通り野生株での母細胞中の Sec7-GFP の蛍光半減期が 2 倍以上短い事が明らかとなった。この結果は、*ypt11* 遺伝子欠損株では、ゴルジ体と Myo2 を結ぶ事が出来ず、また、Lat-A 処理細胞では運ぶレールであるアクチンケーブルが失われた事により Sec7 が移動出来なくなった事に起因していると結論した。

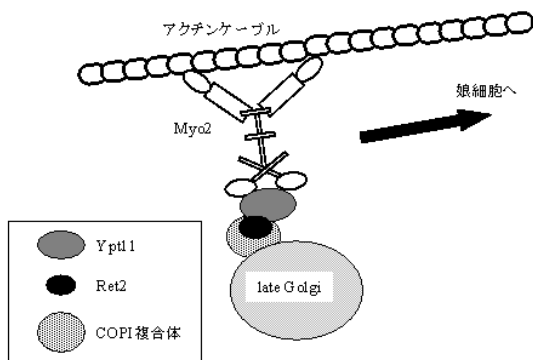


図. Myo2 によるゴルジ体インヘリタンスの模式図

以上、本研究によりゴルジ体は、ゴルジ体膜に存在している Ret2 と Ypt11 が結合し、Ret2-Ypt11 複合体に Myo2 が結合する事でアクチンケーブルに沿って母細胞から娘細胞へと分配される事が初めて示された。

