

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 18 年度博士課程 進学  
氏 名 佐藤啓介  
指導教員名 依田幸司

論文題目 出芽酵母分泌経路の機能未知必須膜タンパク質の解析

出芽酵母は真核生物のモデルとして、細胞生物学研究のあらゆる分野において利用されている生物である。1996 年に全ゲノムの塩基配列解読が完了して以降は、強力な遺伝学的手法が適用可能であることを武器に、genome-wide な網羅的解析が盛んに行われている。しかし、破壊株コレクションが既に作られている非必須遺伝子に比べ、必須遺伝子の場合は破壊株を作れないこともあり、網羅的解析の質・量が共に不十分で、未だ機能の解明に至っていない必須タンパク質が数多く存在する。本研究では、それら機能未知の必須タンパク質の中で、小胞体からゴルジ体を経て細胞質膜へと続く「分泌経路」で機能するものを同定し、さらにその機能を明らかにすることを目的として、以下の解析を行った。

### 1. 温度感受性変異株の作製とサブレッサースクリーニング

15 の機能未知かつ膜貫通領域を持つと推定された必須タンパク質に GFP 等のタグを付加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察して局在を決定した。その結果、6 つが小胞体・2 つがゴルジ体に局在することを見出した。これらの機能解析の第一歩として、まずそれぞれの遺伝子について error-prone PCR によりランダムに変異を導入し、許容温度 (25°C) では野生株同様に生育するが、制限温度 (37°C) では生育が著しく阻害される「温度感受性変異株(ts 株)」を作製した。ts 株を利用すると、その表現型から機能を推測することができるだけでなく、遺伝学的手法を用いて機能的に近いタンパク質をコ

ードする遺伝子を同定することが出来る。また、温度シフトという簡便な操作により短時間で明確な表現型を観察できることが多いのも、*ts* 株を使う利点である。結果として7つの遺伝子の *ts* 株を作製し、*ymr298w<sup>ts</sup>* に対してはセラミド分解酵素をコードする *YPC1*, *ynl158w<sup>ts</sup>* に対しては GPI アンカー合成におけるマンノース転移酵素をコードする *GPI18*, *yfr042w<sup>ts</sup>* に対しては $\beta$ -1,6-グルカン合成に関わる分子シャペロンをコードする *ROT1* が、それぞれ多コピーサプレッサーとなることを見出した。さらに、*ydr367w<sup>ts</sup>* に対するサプレッサーとして、スフィンゴ脂質合成に必須な *AURI* を同定した。本研究では、これらサプレッサーを手がかりとして、主に *Ynl158w* (*Pga1*), *Ydr367w* (後に *Kei1* と命名した) の機能を詳細に解析した。

## 2. *Ynl158w* (*Pga1*) の解析

GPI アンカーは真核生物に広く保存されたタンパク質の修飾形式で、種間を越えて共通のコア構造を持つ複合糖脂質 GPI が、タンパク質 C 末端の特定のシグナル配列に置き換わる形で付加されたものである。GPI は小胞体で合成され、完成した GPI は小胞体内腔でシグナル配列を持つタンパク質に転移される。GPI が付加されたタンパク質は小胞体からゴルジ体へと輸送され、多くは細胞質膜まで輸送される。GPI アンカーは膜にタンパク質を係留する「錨」として働き、多くの場合細胞質膜の表面にタンパク質を提示するのに役立っている。

出芽酵母の GPI は4つのマンノースを有しており、マンノースを付加する酵素はその順番から GPI-MT-I, II, III, IV と呼ばれている。*pag1<sup>ts</sup>* のサプレッサーとして同定した *GPI18* は GPI-MT-II をコードすると報告されていたこと、*pgal<sup>ts</sup>* の表現型は GPI アンカー合成変異株に共通して見られるものが多いことから、*Pga1* が GPI の合成に関わる可能性が示唆された。出芽酵母において、タンパク質に結合した形で検出されるイノシトールは全て GPI 由来であることが知られている。そこで、 $[^3\text{H}]$ inositol を培地に加えて細胞を培養して metabolic labeling を行い、タンパク質に結合した GPI をトリチウムのシグナルとして検出し、野生株と *pgal<sup>ts</sup>* で比較した。その結果、制限温度で培養した *pgal<sup>ts</sup>* において、トリチウムのシグナルが顕著に減少していた。このことから、*pgal<sup>ts</sup>* ではイノシトールのタンパク質への取り込みが不全になっていることが分かり、GPI の合成またはタンパク質への転移に欠損があると考えられた。次いで、*Pga1* と *Gpi18* の *in vivo* での結合を免疫沈降法により検討したところ、*Gpi18* が *Pga1* と共沈してくることを見出した。さらに、 $[^3\text{H}]$ inositol で metabolic labeling した細胞から脂質を抽出し、どのような GPI 中間体が蓄積しているかを調べた。その結果、*gpi18<sup>ts</sup>* で蓄積するものと TLC 上の移動度が全く等しい GPI 中間体が *pgal<sup>ts</sup>* でも蓄積しており、*pgal<sup>ts</sup>* は GPI-MT-II の活性に欠損があることが分かった。以上のことから、*Pga1* は *Gpi18* と *in vivo* で結合して GPI-MT-II 複合体を形成しており、さらにその活性に必須なサブユニットであると結論した。

これまでに発芽酵母で見つかっている、GPI アンカーの合成に直接関わる全ての遺伝子は動物細胞にホモログを持つが、*PGA1* には哺乳類ホモログは無い。そこで、*Gpi18* の哺乳類ホモログである *PIG-V* が *Gpi18* と *Pga1* 両方の機能を併せ持っている可能性を考えた。*GPI18* は必須遺伝子であり、その破壊は致死であるが、*PIG-V* 遺伝子を  $\Delta$ *gpi18* に導入すると生育を部分的に相補すると報告されていた。*PIG-V* 遺伝子を  $\Delta$ *pgal1* に導入したところ、 $\Delta$ *gpi18* に導入したときと同程度の生育の相補が認められた。このことから、哺乳類には *Pga1* のホモログは無いが、機能的には *PIG-V* が酵母における *Gpi18-Pga1* 複合体に対応していると考えられた。

### 3. *Ydr367w* (*Kei1*) の解析

スフィンゴ脂質は、真核細胞の膜を構成する脂質で、セラミド骨格を有するものを指す。セラミドの新規合成は小胞体で行われ、さらにゴルジ体に運ばれて修飾を受けるが、修飾様式は生物種によって異なる。発芽酵母においては、まずイノシトールリン酸が付加されて *IPC* となり、*IPC* にはさらにマンノースが付加されて *MIPC* に、*MIPC* には再びイノシトールリン酸が付加されて *M(IP)<sub>2</sub>C* となる。この修飾の過程で、最初のステップの *IPC* 合成だけが酵母の生育に必須な過程であることが知られている。本研究で *ydr367w<sup>Δ</sup>* のサプレッサーとして同定した *AUR1* は、この *IPC* 合成を行う *IPC* シンターゼをコードしていると報告されていた。

*Ydr367w* の機能解析にあたり、まず *C* 末端に *GFP* を付加して細胞内で発現させた。この *Ydr367w-GFP* の *SDS-PAGE*・ウェスタンブロット解析を行うと、泳動度の異なる 2 本のバンドが検出された。さらに遠心分画を行ったところ、サイズの大きいバンドは小胞体局在の、サイズの小さいタンパク質はゴルジ体局在の挙動を示し、*Ydr367w* はゴルジ体に運ばれた後、何らかのプロセッシングを受けているのではないかと推測された。そこで、late ゴルジのエンドプロテアーゼ *Kex2* の関与を考え、*kex2* 破壊株で *Ydr367w-GFP* を発現させたところ、サイズの小さいバンドは殆ど検出されなかった。*Kex2* は塩基性残基を好んで認識する。*Ydr367w-GFP* の 135 番目のアルギニン残基 (135R) をセリンに置換したところ、サイズの小さいバンドが殆ど消失した。よって、*Ydr367* は *Kex2* に 135R を認識され、切断を受けると考えられた。

*AUR1* が *ydr367w<sup>Δ</sup>* のサプレッサーとなることは、*Ydr367w* がスフィンゴ脂質合成に関わる可能性を示唆している。実際、*Aur1* に作用して *IPC* の合成活性を抑えることにより細胞毒性を示す薬剤 *Aureobasidin A* に *ydr367w<sup>Δ</sup>* が高感受性を示したことから、*ydr367w<sup>Δ</sup>* は *IPC* 合成に欠損があると考えられた。まず、*Ydr367w* が *Aur1* に直接結合している可能性を考え、免疫沈降により検証した。その結果、*Triton X-100* で可溶化した lysate から、両者が互いに共沈することが分かった。すなわち、*Ydr367w* と *Aur1* は *in vivo* で結合し、*IPC* シンターゼ複合体を形成していると考えられた。次に、野生株および *ydr367w<sup>Δ</sup>* から免疫学的に *IPC* シンターゼを精製し、セラミドの蛍光基質アナログ

C<sub>6</sub>-NBD-ceramide を C<sub>6</sub>-NBD-IPC に変換する活性を指標にして酵素活性を比較した。その結果、*ydr367w<sup>Δ</sup>* 由来の IPC シンターゼは、許容温度で培養した細胞から精製したにもかかわらず、殆ど活性を失っていた。以上のことから、*Ydr367w* は IPC シンターゼの活性に必須なサブユニットであると結論し、*YDR367w* を *KEI1* と命名した (**Kex2-cleavable protein Essential for IPC synthesis I**)。

さらに、IPC シンターゼの活性低下以外の *kei1<sup>Δ</sup>* の重要な表現型として、*Aur1* の存在量が減少することを見出した。*kei1<sup>Δ</sup>* 株の *PEP4* を破壊して液胞プロテアーゼ群を失活させると減っていた *Aur1* の量が回復し、その株を顕微鏡観察すると *Aur1* が液胞に蓄積していることが分かった。このことから、*kei1<sup>Δ</sup>* において *Aur1* は安定してゴルジ体に局在できず、液胞に運ばれ分解されていることが分かった。*kei1<sup>Δ</sup>* の変異点を調べたところ、103 番目のフェニルアラニンがイソロイシンに置換され (F103I)、さらにフレームシフトによって細胞質に露出している C 末端部分の 27 アミノ酸が欠失している ( $\Delta$ C) ことが分かった。それぞれ単独の変異では温度感受性を示さないが、*Kei1 $\Delta$ C-GFP* のゴルジ体存在量は野生型と比べて減少しており、さらにこの減少した分は *PEP4* 破壊によって回復した。そこで、C 末端部分がゴルジ体局在に重要であると推測し、GST と連結して大腸菌で大量発現させて精製し、酵母 lysate と混合してプルダウンを行った結果、タンパク質のゴルジ体間リサイクルに必要な COPI コートマーとの結合を見出した。このことから、*Kei1* は IPC シンターゼの活性に必須であるのと同時に、IPC シンターゼが COPI 依存的にゴルジ体間をリサイクルするのも重要であると考えられた。

#### 4. 総括

以上のように、本研究では温度感受性変異株を利用して出芽酵母分泌経路の機能未知必須膜タンパク質の解析を行い、*Pga1* と *Kei1* という 2 つのタンパク質に関し、詳細に機能を解明することに成功した。その他のタンパク質の解析も研究室内で進行中であり、今後の研究の進展が期待される。

#### 発表論文

1) Keisuke Sato, Yoichi Noda, and Koji Yoda **Pga1 Is an Essential Component of Glycosylphosphatidylinositol-Mannosyltransferase II of *Saccharomyces cerevisiae***. *Molecular Biology of the Cell*, 18(9):3472-3485. 2007

2) Kosuke Nakamata, Tomokazu Kurita, M. Shah Alam Bhuiyan, Keisuke Sato, Yoichi Noda, and Koji Yoda ***KEG1/YFR042w* Encodes a Novel Kre6-binding Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Responsible for  $\beta$ -1,6-glucan Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae***. *Journal of Biological Chemistry*, 282(47):34315-34324. 2007