

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380051
 研究課題名 (和文) 分裂酵母細胞内の分泌経路における異常糖タンパク質の認識および分解機構の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of glycoprotein quality control in the secretory pathway of fission yeast cells
 研究代表者
 竹川 薫 (TAKEGAWA KAORU)
 九州大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：50197282

研究成果の概要 (和文)：

高等動物をはじめとする真核生物では分泌タンパク質は粗面小胞体(ER)において立体構造が整えられる。新たに合成された新生タンパク質はERにおいてシャペロンなどの効果により構造が整えられ、うまくフォールディングできなかつたタンパク質はERにおいて分解される。このメカニズムはタンパク質の品質管理機構と呼ばれ、品質管理機構に異常を生じた場合、様々な病気の原因となることが明らかにされている。申請者は分裂酵母を用いて異種タンパク質生産に関する研究を行っているが、分裂酵母においてERにおける品質管理機構についてはほとんど報告がない。そこで本研究では分裂酵母の品質管理機構に関与するタンパク質の解析およびERにおける糖タンパク質の糖鎖構造解析を行った。

研究成果の概要 (英文)：

In both mammalian and yeast cells, proteins entering the secretory pathway adopt their final tertiary structure in the endoplasmic reticulum (ER). ER is the major organelle for folding of newly synthesized secretory proteins. A major regulator of this process is the quality control machinery, which retains and finally disposes of misfolded secretory proteins before they can exit the ER. The ER quality control process is highly conserved in eukaryotic cells, and are linked to a variety of diseases in mammalian cells. However, proteins required for the ER quality control system has not been analyzed and reported in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* except UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase. In this study, we studied proteins required for quality control mechanism of glycoprotein folding, and analyzed the glycosylation and processing of oligosaccharides in the ER in *S. pombe* cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：分裂酵母、糖タンパク質、異常タンパク質、品質管理機構、糖鎖付加

1. 研究開始当初の背景

モデル真核生物である分裂酵母は細胞内小胞輸送機構など同じモデル生物である出芽酵母と類似した点も多いが、糖タンパク質糖鎖部分にガラクトースを含むなど相違点も多く存在する。分裂酵母は細胞の分裂機構が高等動物と類似していることから、これまで細胞周期研究などで盛んに用いられてきたが、タンパク質の細胞内小胞輸送や粗面小胞体における品質管理機構などの研究にはほとんど用いられてこなかった。

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究で、粗面小胞体(ER)で異常な糖タンパク質を認識してプロテアソームにより分解を行う品質管理機構に関与する出芽酵母遺伝子と相同性の高い遺伝子が、分裂酵母ゲノムにも存在することがわかった。そこで本申請では分裂酵母のこれらの遺伝子の機能解析を行ない、ERにおける糖タンパク質の品質管理機構、特にこれまであまり明らかにされていない糖鎖部分の機能に着目して解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

・使用菌株

本研究で使用した分裂酵母野生株はゲノムプロジェクトにより全ゲノム塩基配列が決定された分裂酵母株を起源とするFY18625株(ARC039, *h⁻ leu1-32 ura4-C190T*)を用いた。なおFY187625株はナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)に登録済みである。また胞子形成などの特殊な条件での研究を行うためにはh90野生株(*h⁹⁰ leu1-32 ura4-D18*)を用いた。

・遺伝子破壊方法

通常分裂酵母破壊株の作製方法は従来のマーカー遺伝子を挿入して目的の遺伝子破壊を試みた。目的の遺伝子を分裂酵母染色体からPCRを用いて増幅させ、マーカー遺伝子を制限酵素を用いて目的遺伝子のORF中に挿入した。マーカー遺伝子としては分裂酵母 *ura4* 遺伝子と出芽酵母 *LEU2* 遺伝子を用いた。また多重破壊株を作製する場合には我々の開発したCre-LoxPを用いる方法(Iwaki and Takegawa, Biosci. Biotechnol. Biochem., 68, 545-550, 2004)とLatour法(Hirashima et al., Nucleic Acids Res., 34, e11, 2006)を用いた。マーカー遺伝子を挿入した目的の

伝子DNA断片を分裂酵母野生株にエレクトロポレーションにより形質転換させ、最小培地により生育させた。生育してきたコロニーの遺伝子破壊の確認はコロニーPCR法もしくはサザンハイブリダイゼーションにより行った。

4. 研究成果

(1) 糖タンパク質ヒトトランスフェリンの分裂酵母における発現

分裂酵母においてERにおける糖タンパク質の良いマーカーがこれまで無かったため、我々はヒトトランスフェリン(hTF)を分裂酵母細胞内で発現させ、その生産性について検討を行った。hTFは約80kDaの可溶性タンパク質であるが2箇所のN結合型糖鎖修飾部位(Asn-X-Ser(Thr)配列)を持つため、分裂酵母で発現させるとN結合型糖鎖の付加により約110~120kDa程度の分子量を示す。また本タンパク質のN末端領域には細胞外への分泌シグナルを保持しているため、細胞外に分泌される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、シャペロンタンパク質であるprotein disulfide isomeraseであるPdi1タンパク質と糖鎖付加されない変異hTFではあるが、Pdi1を過剰発現させることでhTFの分泌生産が向上することが報告されている。そこでこのような効果が分裂酵母においても見られるか検討を行った。分裂酵母のゲノムデータベースにおいて検索したところ、分裂酵母には *PDI1* 遺伝子のホモログがSPAC1F5.02、SPAC17H9.14c、SPBC3D6.13c、SPAC959.05c、SPCC1840.08cの5種類存在することが明らかになった。そこでこれらの遺伝子をhTF発現株において共発現することを試みた。分裂酵母のゲノムからPCR法によりそれぞれの遺伝子を増幅し多コピー高発現型ベクターpREP1にクローニングし、それぞれの発現ベクターを作成した。それぞれの発現ベクターを分裂酵母プロテアーゼ欠損株に導入した。これらの株を基本培地で48時間培養した後、培養上清を回収しウエスタン解析により解析した結果、SPAC17H9.14c、PBC3D6.13c、SPAC1F5.02発現株においては顕著な生産向上が見られた。

過剰発現によりhTFの生産向上を示したSPAC17H9.14c、PBC3D6.13cとSPAC1F5.02の細胞内局在を検討するため、それぞれの

遺伝子に GFP を連結してその細胞内局在を調べた。その結果、これらのタンパク質は全て ER に局在していることがわかった(図 1)。

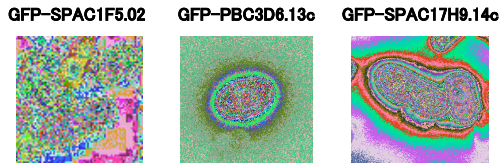


図 1 3 種の PDI ホモログの局在

以上の結果、分裂酵母においてこれらの PDI ホモログは ER 内でタンパク質のフォールディングに寄与していることが明らかになった。PDI は ER において分泌系タンパク質等の立体構造安定化を担う分子シャペロンとして機能していることが出芽酵母等の研究から明らかとなっている。つまり ER における品質管理機構が hTF の分泌量に大きな影響を与えている可能性を示唆していると考えられた。

(2) 出芽酵母 CPY 変異体を用いた分裂酵母 ERAD 機構の解析

私たちは、ER の品質管理機構のひとつである、ERAD (ER-Associated Degradation) について分裂酵母を用いて解析を行った。タンパク質は ER において PDI や Bip といった分子シャペロンにより安定化し、正しい立体構造をとることが促進されるが、一定量の異常なタンパク質の発生は常に起こる。ERAD は ER で生じた異常・変性タンパク質に対する分解機構である。その機構については、動物細胞や出芽酵母で多くの報告がなされ、ERAD 関連タンパク質がさまざまな変性タンパク質や過剰に発現したタンパク質が引き起こすストレスに Ire1p などが応答し、それら変性タンパク質の ER 外への排出とプロテアソーム分解に関与することが示されている。(図 2)

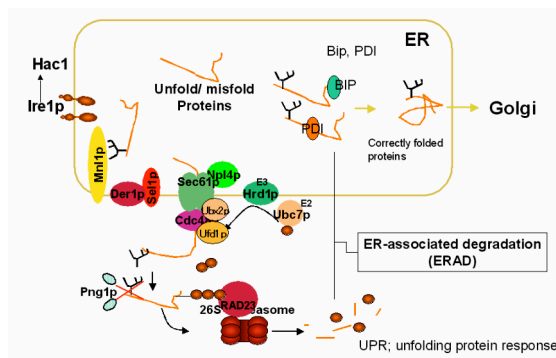


図 2 出芽酵母における ERAD 関連タンパク質

出芽酵母では ER ストレスは Ire1p などにより感知され、転写因子である *HAC1* 遺伝子を活性化することで PDI などの分子シャペロンの発現増加、もしくは ERAD の活性化を誘導する。しかしながら、分裂酵母における ERAD の機構についてはほとんど報告がない。そこで我々は、分裂酵母における ERAD 関連遺伝子のゲノムデータベースからの抽出を行ったところ、数多くの ERAD 関連遺伝子群のホモログが見出された(表 1)。

表 1 ERAD に関わる分裂酵母ホモログ遺伝子の一覧

<i>Scerevisiae</i>	<i>S.pombe</i>	相同性
<i>IRE1</i> (YHR079C)	<i>ire1+</i> SPAC167.01	60%
<i>PNG1</i> (YPL096W)	<i>png1+</i> SPBC1709.14	57%
<i>UBC7</i> (YMR022W)	<i>ubc3+</i> SPBP16F5.04	76%
<i>SEL1</i> (YML013W)	<i>sel1+</i> SPCC285.11	50%
<i>HRD1</i> (YOL013C)	<i>hrd1+</i> SPBC17D11.02c	45%
<i>DER1</i> (YBR210W)	<i>der1+</i> SPBC365.08c	52%
<i>NPL4</i> (YBR170C)	<i>npl4+</i> SPBC1711.10c	61%
<i>UBC6</i> (YMR100W)	<i>ubc6+</i> SPAC10F6.05c	77%
<i>DOA10</i> (YIL030C)	<i>doa10+</i> SPBC14F5.07	51%
<i>MDM39</i> (YGL020c)	<i>mdm39+</i> SPBC543.10	47%

そこでこれらの分裂酵母遺伝子破壊株を作成して、これらの遺伝子が実際に分裂酵母でも ERAD 経路に関与しているのか解析を行った。

出芽酵母では ERAD の解析に、CPY の 1 アミノ酸を変異させ、タンパクの立体構造を不安定化させた CPY* をマーカーに用いている。そこで分裂酵母でも出芽酵母 CPY を発現させて解析を行うことにした。分裂酵母に出芽酵母 CPY 遺伝子 (*PRC1*) を分裂酵母 pREP41 ベクターを用いて発現させた。その結果、出芽酵母 CPY は分裂酵母細胞内でも液胞へ輸送され、タンパク分解を受けて成熟型へ変換されることがわかった。なお出芽酵母 CPY は分裂酵母細胞内では少し分子量の増大が認められた。そこで N-結合型糖鎖を遊離する Endo-H を作用させたところ、出芽酵母で発現させた CPY と

同じ分子量になったことから、分子量の違いは N-結合型糖鎖のサイズによるものであることがわかった (図 3)。

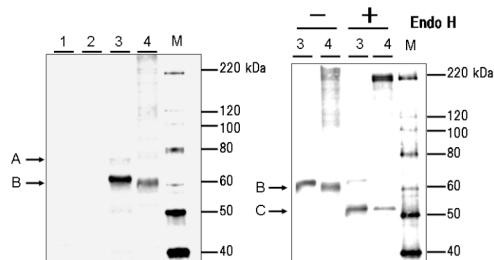


図 3 出芽酵母 CPY の分裂酵母細胞内での発現。CPY の発現は出芽酵母 CPY 抗体を用いてウエスタン解析による検出した。左図レーン 1; 分裂酵母野生株, 2; 分裂酵母+ベクター, 3; 分裂酵母に出芽酵母 CPY を発現, 4; 出芽酵母細胞内 CPY。右図分裂酵母および出芽酵母で発現させた出芽酵母 CPY を Endo-H 処理した (+) 結果。

次に出芽酵母 CPY に変異を導入した CPY* を分裂酵母細胞内で発現させた。分裂酵母菌体を対数増殖期まで培養し、シクロヘキシミドを添加して新たなタンパク合成を停止させた。その後、経時的に集菌して、細胞破碎液を調製して解析を行った。その結果、CPY* は分裂酵母細胞内においても不安定でプロ型 (ER 局在型) で ER に局在して、経時的に分解されていくことがわかった (図 4)。この結果は分裂酵母で初めて ERAD 経路が存在することを証明したものである。興味深いことに出芽酵母で ERAD 経路に関与する *UBC7* 遺伝子と高い相同性を示す分裂酵母遺伝子の破壊株 (*ubc7*) で CPY* の安定性を調べたところ、野生株よりも安定に ER 内に蓄積していることが確認できた。

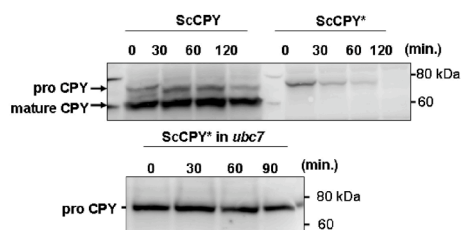


図 4 分裂酵母における出芽酵母 CPY* の発現。出芽酵母 CPY* は分裂酵母では proCPY (ER 局在型 CPY) として検出され、経時的に分解される。一方、分裂酵母 *ubc7* 破壊株では安定に ER 内に蓄積していることがわかった。

本研究で、これまで明らかにされていなかった分裂酵母 ERAD 経路の存在を初めて明らかにすることができた。今後はさらに解析を進めて、出芽酵母や高等動物の ERAD 経路や関与する遺伝子と比較しながら、分裂酵母の ERAD 経路に関する研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- Ikeda, Y., Ohashi, T., Tanaka, N., and Takegawa, K.: Identification and characterization of a gene required for alpha1,2-mannose extension in the O-linked glycan synthesis pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Yeast Res, 9, 115-125 (2009). 査読有
- Ohashi, T., Ikeda, Y., Tanaka, N., Nakakita, S., Natsuka, S., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K.: Tha och1 mutant of *Schizosaccharomyces pombe* produces galactosylated core structures of N-linked oligosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 407-414 (2009). 査読有
- Takegawa, K., Tohda, H., Sasaki, M., Idiris, A., Ohashi, T., Mukaiyama, H., Giga-Hama, Y., and Kumagai, H.: Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system. Biotechnol. Appl. Biochem. 53, 227-235 (2009). 査読有
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., and Takegawa, K.: Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. Appl. Microbiol. Biotechnol., 86, 403-417 (2010). 査読有
- Ohashi, T., and Takegawa, K.: Structure of the N- and O-linked oligosaccharides that show complete loss of galactose residues from *gms1och1* mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 86, 263-272 (2010). 査読有
- Mukaiyama, H., Tohda, H., and Takegawa, K.: Overexpression of protein disulfide isomerases enhances secretion of recombinant human transferrin in *Schizosaccharomyces pombe*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 86, 1135-1143 (2010). 査読有

〔学会発表〕(計 17件)

1. 竹川 薫、浜 祐子：分裂酵母の細胞内小胞輸送経路の解析と異種タンパク質生産への応用、第 18 回酵母合同シンポジウム、(2008) 6.5-6 甲南大学
2. 大橋貴生、田中直孝、浜 祐子、竹川 薫：分裂酵母の N-結合型糖鎖生合成に関与する糖転移酵素欠損株の糖鎖構造解析、平成 20 年度日本農芸化学会西日本支部大会 (2008) 9.19-20 長崎大学
3. 向山博幸、浜 祐子、竹川 薫：分裂酵母 PDI ホモログ遺伝子の過剰発現による異種タンパク質の分泌強化、平成 20 年度日本農芸化学会西日本支部大会 (2008) 9.19-20 長崎大学
4. 竹川 薫：酵母を用いた異種糖タンパク質分泌生産におけるグリコシル化の役割、第 6 回糖鎖科学コンソーシアム(JCGG)シンポジウム (2008) 12.3-4 東京
5. 鈴木章太郎、松沢智彦、竹川 薫、田中直孝：分裂酵母におけるハイマンノース型糖鎖の糖タンパク質と相互作用する生体内レクチン様タンパク質の機能解析、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (2008) 12.9-12 神戸
6. 大橋貴生、浜 祐子、竹川 薫：分裂酵母のドリコールリン酸オリゴ糖生合成に関与する糖転移酵素欠損株の糖鎖構造解析、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009) 3.27-29 福岡
7. 向山博幸、浜 祐子、竹川 薫：分裂酵母 PDI ホモログ遺伝子の過剰発現によるヒト由来トランスフェリンの分泌強化、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009) 3.27-29 福岡
8. 浜 祐子、竹川 薫：分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を宿主とした発現系の工夫 -最適化をめざして-、日本農芸化学会 2009 年度大会 (2009) 3.27-29 福岡
9. 向山博幸、浜 祐子、竹川 薫：分裂酵母 PDI ホモログ遺伝子の過剰発現による異種タンパク質の分泌強化、平成 21 年度日本生化学会九州支部例会、5.16-17 九州大学
10. 竹川 薫：分裂酵母を用いた有用物質生産システムの開発、日本農芸化学会西日本支部例会シンポジウム (2009) 5.29 大分
11. 向山博幸、東田英毅、竹川 薫：分裂酵母における異種タンパク質の分泌生産性を向上させる諸条件の検討、第 42 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 (2009) 7.28-30 つくば
12. 大橋貴生、東田英毅、田中直孝、竹川 薫：分裂酵母におけるガラクトース転移酵素遺伝子欠損株の諸性質の解析、第 42 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 (2009) 7.28-30 つくば
13. Hiroyuki Mukaiyama, Hideki Tohda, and

Kaoru Takegawa: Improvement of secretory production of heterologous proteins in fission yeast. The 5th International Fission Yeast Meeting (2009) 10.26-31 Tokyo

14. Takao Ohashi, Hideki Tohda, Naotaka Tanaka, and Kaoru Takegawa: Characterization of galactosyltransferase-deficient mutants in fission yeast. The 5th International Fission Yeast Meeting (2009) 10.26-31 Tokyo

15. 石津佳祐、大橋貴生、向山博幸、竹川 薫：分裂酵母 Png1 タンパク質の機能解析、第 27 回イーストワークショップ (2009) 11.13-14 飯塚

16. 向山博幸、東田英毅、竹川 薫：分裂酵母カルボキシペプチダーゼ Y の細胞内プロセッシングと成熟化機構の解明、2010 年日本農芸化学会大会 (2010) 3.27-30 東京

17. 平井 啓介、岡本 紘一、細見 昭、竹川 薫、田中 直孝：分裂酵母の糖鎖修飾及び BiP の漏出に関与する Gmn2p の解析、2010 年日本農芸化学会大会 (2010) 3.27-30 東京

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹川 薫 (TAKEAGWA KAORU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：5 0 1 9 7 2 8 2

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

鈴木 匡 (SUZUKI TADASHI)

理化学研究所・基盤研究所・糖鎖代謝学

チーム・チームリーダー

研究者番号：9 0 3 4 5 2 6 5