

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007-2008
課題番号：19580391
研究課題名 (和文) 「リソソーム・液胞系」タンパク質分解による細胞の環境適応機構の分子基盤
研究課題名 (英文) Molecular basis on cellular mechanism of environmental response by lysosomal/vacuolar proteolysis
研究代表者 新谷 尚弘 (SHINTANI TAKAHIRO) 東北大学・大学院農学研究科・准教授 研究者番号：70374973

研究成果の概要：

真核生物のモデル生物である出芽酵母を用い、液胞によるタンパク質分解機構が外界からの環境ストレス応答や細胞内で生じた異常タンパク質のクリアランスに重要な役割を果たしていることを示し、その過程に関わる因子を明らかにした。具体的には外界栄養条件に応じたモノカルボン酸輸送体の細胞膜からの除去、折り畳みに異常がある分泌タンパク質の除去機構について解析した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学

キーワード：応用分子細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

細胞は刻々と変化する環境条件やストレスに適応して、必要なタンパク質の質と量を制御している。タンパク質の質的变化は翻訳後修飾などのタンパク質の構造変化により引き起こされる。一方、タンパク質の量的変化は、タンパク質の合成と分解により制御される。20世紀半ばにDNA構造が解明されて以来、生物機能はタンパク質合成の制御（遺伝子の転写制御、転写産物の翻訳制御）、あるいは発現タンパク質の翻訳後修飾による機能制御を中心に議論されてきた。しかし、近年様々な生物機能の制御においてタンパク

質分解が重要な役割を果たしていることが示されている。真核生物の細胞内タンパク質分解の主要なシステムとして、「ユビキチン-プロテアソーム系」、「リソソーム・液胞系」が挙げられるが、いずれの場合も分解されるものとそうでないものを厳密に区別する必要がある。ユビキチン-プロテアソーム系は、ユビキチンがエネルギー依存的に基質タンパク質に結合し、それが目印となりプロテアソームで分解されるシステムであり、タンパク質のユビキチン化という反応制御により分解タンパク質を識別している。一方、「リソソーム・液胞系」はリソソーム（植物・菌

類では液胞) という一群の加水分解酵素を含むオルガネラでタンパク質を分解するシステムであり、その制御には分解タンパク質のリソソームへの選択的輸送機構を伴う。リソソームは長く「老廃物の処理を担う」という消極的な役割を持つ程度にしか認識されてこなかった。しかし、近年、本来リソソームで処理されるべき「老廃物」の蓄積が、アルツハイマー病を始めとする神経変性疾患などの原因となっていることが示されており、リソソーム・液胞の重要性が再認識されている。

2. 研究の目的

当該研究では、出芽酵母をモデルとし、次に示す課題を例とし、「異常」または「過剰」タンパク質の液胞によるクリアランス機構について解析することを目的とした。

(1) 異常分泌タンパク質の液胞におけるクリアランス機構

真核生物において、分泌タンパク質や膜タンパク質は翻訳された後、小胞体において正しい立体構造への折り畳み（フォールディング）やタンパク質複合体形成（アッセムブリ）などの高次構造の形成が行われる。小胞体にはこのタンパク質の高次構造形成を保証するための品質管理機構が備わっている。即ち、立体構造に異常が認められたタンパク質は小胞体から細胞質へ逆行輸送され、プロテアソームで分解される。この機構は小胞体関連分解(endoplasmic reticulum-associated degradation; ERAD)と呼ばれる。出芽酵母のカルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の1アミノ酸置換体 CPY*は、ERAD で分解されるモデル基質として広く利用されている。私たちは、CPY*に正常な分泌タンパク質であるインベルターゼを融合した CPY*-Inv は ERAD では分解されず、小胞体からゴルジ体を経由し液胞で分解されることを明らかにしてきた。さらに、液胞への選別は Vps10 というレセプタータンパク質が関わっていることを明らかにしている。Vps10 は液胞に局在する加水分解酵素の輸送レセプターであることが知られているが、その分解基質となるタンパク質の輸送にも関わっていることは非常に興味深い。そこで、Vps10 によるこれら輸送基質の認識機構を明らかにすることを具体的な目的とした。

(2) 外界環境の変化に伴う細胞膜タンパク質の液胞による選択的ターンオーバーの制御機構

細胞は常に外界環境にさらされている。その最前線である細胞膜は、栄養源やホルモンなどの外部刺激の変化と対峙しており、細胞は細胞膜上のレセプターや輸送体の最適化を行う必要がある。この最適化は、細胞膜タンパク質の合成と分解によって制御される。

その分解は細胞膜からのエンドサイトーシスに依存して起こる。細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスによるダウンレギュレーションの理解は、出芽酵母における知見が多大な貢献をしてきた。その出芽酵母においては、輸送体はユビキチン化依存的に細胞膜から細胞内へ取り込まれた後、エンドソームを経由して液胞へ輸送される。現在までの膨大な研究の結果、その過程に必要な基本的な分子装置も明らかにされつつある。しかしながら、多様な外界環境の変化に応じて引き起こされる輸送体やレセプターの選択的ターンオーバーがどのように制御されるかは未だ不明な点が多い。そこで、当該研究では出芽酵母のモノカルボン酸輸送体を対象とし、環境変化に伴う分解調節機構について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異常分泌タンパク質の液胞におけるクリアランス機構

分泌タンパク質は翻訳と共役して小胞体膜を透過し、小胞輸送を介してゴルジ体を経由し細胞外に分泌される(図1)。液胞加水分解酵素も同様にゴルジ体に到達するが、Vps10 により認識され、液胞へと選別輸送される。野生型 CPY は直接 Vps10 と結合することが知られている。一方、液胞で分解を受ける CPY*-Inv も Vps10 依存的に液胞へ輸送されることから、Vps10 による CPY と CPY*-Inv の認識機構を比較解析することとした。

① Vps10 における CPY および CPY*-inv 認識領域の解析

CPY*-Inv はそのカルボキシ末端に存在するインベルターゼの活性を指標に局在を解析することができる。例えば、*vps10* 破壊株では CPY*-Inv は細胞外へ分泌されるため、そのインベルターゼ活性はペリプラズム面に存在する。Kielland-Brandt 博士(デンマーク、カールスバーグ研究所)より様々なドメインが欠失している変異型 Vps10 を発現するプラスミドシリーズを分与いただき、変異型 Vps10 を発現する *vps10* 変異株における

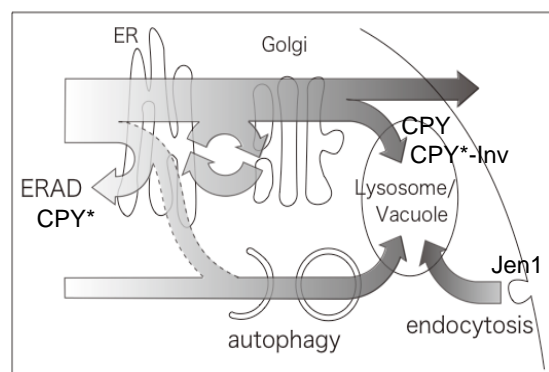


図1 リソソーム・液胞へのタンパク質輸送経路

CPY*-Inv と CPY-Inv の液胞への輸送を解析した。CPY-Inv は野生型 CPY とインベルターゼの融合タンパク質であり、立体構造が正常な液胞加水分解酵素として液胞へ輸送される。

②CPY と CPY*-inv の競合試験

CPY*-inv を発現する株において、野生型 CPY を過剰発現させ、CPY*-inv が細胞外へミスソーティングされるか解析した。

③CPY または CPY*-inv の認識に欠損がある Vps10 変異体の取得と解析

Vps10 のドメイン 2 に相当する DNA 領域に PCR 法を用いてランダム変異を導入した変異 *vps10* 遺伝子ライブラリーを構築した。これら変異株ライブラリーから、CPY または CPY*-inv の液胞への輸送に異常が生じる株を選抜した。

(2) 外界環境の変化に伴う細胞膜タンパク質の液胞による選択的ターンオーバーの制御機構

出芽酵母のモノカルボン酸輸送体 Jen1 は乳酸とピルビン酸の取り込みに必要な輸送体である。その発現と分解は培地中のグルコースによって厳密に制御されている。当該研究では、出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、モノカルボン酸輸送体の分解に関わる遺伝子をゲノム規模で同定し、その分解制御機構の全容を解明することとした。出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリー（約 4,500 株を含む）を購入し、エピトープタグ化した *JEN1-4HA* を含むプラスミドで形質転換した。乳酸を単一炭素源とした寒天培地上でこれらの株を生育させた後、ニトロセルロース膜にコロニーを転写し、直ちにグルコースを含むろ紙上に載せた。1 時間後、ニトロセルロースに付着した酵母細胞をアルカリ-SDS 溶液で溶解後、抗 HA 抗体を用いて残存 Jen1-4HA を検出した。このスクリーニングにより選抜された遺伝子破壊株はさらに、ウェスタンブロッティングにより表現型が確認された。即ち、乳酸を単一炭素源とした液体培地で培養後、グルコース（終濃度 2%）を加え、経時的に細胞を回収した。細胞抽出液を調製し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い、Jen1-4HA の減少を観察した。

また、Jen1 に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合した Jen1-GFP を酵母株で発現させ、蛍光顕微鏡観察により Jen1 の局在を観察した。

4. 研究成果

(1) 異常分泌タンパク質の液胞におけるクリアランス機構

Vps10 は 1557 アミノ酸残基で構成される I 型膜貫通タンパク質であり、1393 アミノ酸残基からなるアミノ末端のルーメンドメイン、

カルボキシ末端側に 164 アミノ酸残基からなる細胞質ドメインを有する。ルーメンドメインには約 20% の相同性を持つ 2 つの領域 (ドメイン 1、ドメイン 2) が存在し、それぞれ約 50 アミノ酸からなる配列の 7 回反復構造をとっている (図 2)。まず、Vps10 における CPY-Inv (正常タンパク質) と CPY*-Inv (異常タンパク質) の認識領域を解析した。Kielland-Brandt 博士 (デンマーク、カールスバーグ研究所) から分与された変異型 *vps10* プラスミドと CPY-Inv または CPY*-Inv プラスミドを同時に *preAsuc2Δvps10Δ* 株に導入し、細胞内外のインベルターゼ活性を測定した。その結果、CPY-Inv、CPY*-Inv とも Vps10 のドメイン 2 と呼ばれる領域を欠失した *vps10* 変異株において細胞外へミスソートされた。このことより、CPY-Inv と CPY*-Inv の認識部位はともに Vps10 のドメイン 2 に存在していることが示唆された。

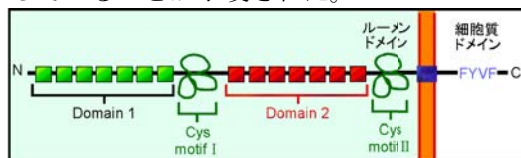


図 2 Vps10 の構造模式図

つぎに、CPY-Inv と CPY*-Inv の認識部位が共通であるか競合試験により解析した。CPY-Inv と CPY は Vps10 中の結合部位を共有していると考えられる。従って、CPY を過剰発現した場合、CPY と CPY-Inv は結合部位を競合し、細胞外へミスソートされると予想される。インベルターゼ活性を指標とし CPY-Inv の局在を解析したところ、予想通り CPY の過剰発現で CPY-Inv は細胞外へミスソートすることが示された (図 3)。一方、CPY を過剰発現しても CPY*-Inv の局在はあまり影響を受けなかった (図 3)。

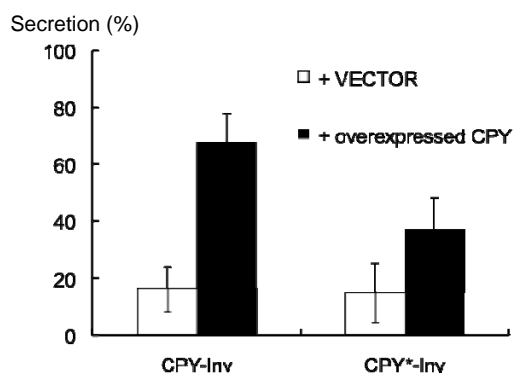


図 3 CPY 過剰発現の CPY*-Inv 局在への影響

Vps10 による CPY の認識にはそのプロ配列中の Glu₂₄-Arg-Pro-Leu₂₇ のペプチド配列が重要であることが知られている。予想通り、

CPY-Inv 中の Glu-24 をリシンに置換した CPY(Q24K)-Inv が細胞外にミスポートされることを確認した (図 4)。このシグナルが CPY*-Inv の Vps10 による認識に関わるか解析した。同様に CPY*-Inv の Glu-24 をリシンに置換し、局在を解析したところ、CPY*(Q24K)-Inv は液胞へ輸送されることが明らかとなった (図 4)。このことは CPY*-Inv の液胞への輸送には Glu₂₄-Arg-Pro-Leu₂₇ シグナルは必須ではないことを示している。先の結果と合わせ、CPY-Inv と CPY*-Inv の Vps10 による認識機構は異なることが示された。

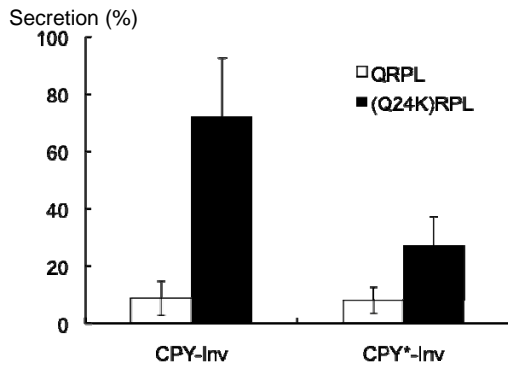


図 4 液胞輸送シグナルの CPY*-Inv 局在への影響

CPY と CPY*-Inv の認識部位を同定するため、エラープローン PCR 法によりドメイン 2 にランダム変異を導入し、どちらか一方がミスポートされる Vps10 変異体の単離を試みた。約 1,000 株をスクリーニングし、4 株の変異株を得た。これらの株では CPY*-Inv は正常に液胞へ輸送されるが、CPY は細胞外にミスポートされた。これら Vps10 変異体の変異部位を特定したところ、1,000 から 1,070 番目のアミノ酸残基の領域にアミノ酸置換が生じていた。この領域が CPY の認識に重要であることが示唆されたが、CPY のミスポートは部分的であり、明確に CPY 認識部位を特定するには更なる解析が必要である。

(2) 外界環境の変化に伴う細胞膜タンパク質の液胞による選択的ターンオーバーの制御機構

出芽酵母の遺伝子破壊株ライブラリーを用い、グルコースに依存した Jen1 タンパク質の分解に関与する遺伝子をスクリーニングした。その結果、エンドサイトーシス (*END3*, *END4*, *SLA1*, *SAC6*, *ROD1* など)、multivesicular body (MVB) 経路 (*STP22*, *VPS36*, *SNF7*, *SSH4* など)、液胞への輸送 (*VAM7*, *VPS8*, *VPS16*, *VPS41* など)、エンドソームからゴルジ体への輸送 (*VPS35*, *YPT6*, *RGP1* など)、ユビキチン代謝 (*DOA4*)、液胞プ

ロテアーゼ (*PRB1*, *PEP4*)、液胞 V-ATPase (*VMA9* など) など膜タンパク質の代謝に関与することが知られている遺伝子群が Jen1 タンパク質の分解に関与する遺伝子として同定された。この他に糖鎖修飾 (*MNV1*) や脂質修飾 (*SWF1*)、乳酸代謝 (*DID1*) に関わる遺伝子が関与することが示された。さらに機能未知の遺伝子 (*SHE10*, *BOP2*, *SWC5*) も見出された。

これら遺伝子破壊株における Jen1 の局在を観察するために、Jen1-GFP をそれぞれの遺伝子破壊株で発現させ、蛍光顕微鏡観察を行った。野生株ではグルコース添加後、Jen1 GFP は速やかにエンドサイトーシスにより細胞内部に取り込まれ、液胞へ輸送される (図 1)。エンドサイトーシス欠損株では Jen1-GFP はグルコース添加後も細胞膜上に局在した。MBV 経路欠損株では液胞膜と肥大化したエンドソームに Jen1-GFP は局在し、Jen1 はエンドサイトーシスされた後、MVB 経路によって液胞へ輸送されることが確認された。また、エンドソームや液胞への小胞輸送に欠損がある変異株では細胞中の無数のドットとしてその局在が観察された。液胞 V-ATPase の変異株では、Jen1 の液胞への輸送は正常であった。液胞におけるタンパク質分解に欠損があることが推定される。

また、細胞膜上での膜タンパク質のユビキチン化に関与していることが知られている Rsp5 ユビキチンリガーゼの温度感受性変異株を用いて、Jen1 の分解を観察したところ、非許容温度下で Jen1 の分解が抑制された。この条件下で、Jen1-GFP は細胞膜に局在したことから、Rsp5 による Jen1 のユビキチン化はエンドサイトーシスに必要であることが示された。

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 1 件)

- ① Takahiro Shintani, Fulvio Reggiori, Fluorescence microscopy-based assays for monitoring yeast Atg protein trafficking, *Methods in Enzymology*, 査読無, 451 巻, 2008 年, 43-56

[学会発表] (計 5 件)

- ① 須山研吾, 五味勝也, 新谷尚弘, 異常分泌タンパク質の小胞体関連分解 (ERAD) と輸送小胞への取り込みは競合している, 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 年 12 月 10 日, 神戸ポートアイランド
- ② Kengo Suyama, Katsuya Gomi, Takahiro Shintani, A luminal misfolded

proteinretaining the endoplasmic reticulum exit signal bypasses the ER-associated degradation and is sorted to the vacuole for degradation by the vacuolar sorting receptor Vps10, 2008 Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting, 2008年7月23日, トロント (カナダ)

- ③ 須山研吾、五味勝也、新谷尚弘、出芽酵母における小胞体関連タンパク質分解の回避機構の解析、日本農芸化学会2008年度大会、2008年3月27日、名城大学 (名古屋)
- ④ 柚賀正樹、須山研吾、五味勝也、新谷尚弘、酵母輸送レセプターVps10による異常分泌タンパク質の認識機構の解析、日本農芸化学会2008年度大会、2008年3月27日、名城大学 (名古屋)
- ⑤ 須山研吾、五味勝也、新谷尚弘、Vacuolar sorting of aberrant secretory proteins in the budding yeast、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月12日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 尚弘 (SHINTANI TAKAHIRO)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：70374973

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

五味 勝也 (GOMI KATSUYA)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：60302197

大箸 信一 (OHASHI SHINICHI)
金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所・教授
研究者番号：90387340