

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780311

研究課題名（和文） 分裂酵母を用いた膜内在性プロテアーゼの機能解析

研究課題名（英文） Analysis of membrane protease function in fission yeast

研究代表者

田中 直孝 (TANAKA NAOTAKA)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：60324109

研究成果の概要（和文）：

分裂酵母の2種類のロンボイド型タンパク質分解酵素（仮称 Rob1, Rob2）は、2種類共にゴルジ体膜に局在した。*rob1*破壊株は亜鉛イオンやコバルトイオンに対する感受性を示しただけでなく、液胞で機能するタンパク質（カルボキシペプチダーゼ Y）が正常に液胞に運ばれず、細胞外へ漏出していることが分かった。さらにゴルジ体膜に存在する膜結合型転写因子の切断過程に関与していることも分かってきた。また、*rob2*破壊株はモネンシンというゴルジ体とエンドソーム間の小胞輸送を阻害する薬剤に対して感受性を示したことから、2種類のロンボイドはゴルジ体で機能し、分泌タンパク質の選別輸送やゴルジ膜局在型の転写因子の活性化機構などに深く関与しているのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：

In fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, two types of rhomboid proteases, named Rob1p and Rob2p, were localized at the Golgi apparatus. *rob1Δ* strain showed susceptibilities to zinc ion and cobalt ion, and missorting vacuole-type CPY (carboxi peptidase Y) to cells surface. Furthermore, there is a high probability that the Rob1p cleave membrane-bound transcription factor at the golgi. *rob2Δ* strain was susceptibility to monensin which is a protein transport inhibitor between the Golgi and endosomes. These results indicate that the two types of rhomboid proteases are deeply-involved in protein sorting and activation of the Golgi resident proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：応用微生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：分裂酵母、ロンボイドプロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体膜に存在するロンボイド型タンパク質分解酵素（ロンボイド）の機能は、ショウジョウバエの上皮細胞増殖因子の遊離に関与する報告のみである。出芽酵母やヒト、植物にもファミリーが存在するが、機能は不明である。

分裂酵母のゲノム中に存在する2種類のロンボイドホモログ遺伝子（仮称 *rob1+*, *rob2+*）の遺伝子破壊株を単離し、様々な表現型の解析を試みている。現在までに明らかになっている事は、2種類共にゴルジ体膜に局在し、Rob1は著しい亜鉛イオンに対する感受性を示しただけでなく、液胞で機能するタンパク質（カルボキシペプチダーゼ Y）が正常に液胞に運ばれず、細胞外へ漏出していることが分かった。また、Rob2はモネンシンというゴルジ体とエンドソーム間の小胞輸送を阻害する薬剤に対して感受性を示したことから、2種類のロンボイドはゴルジ体で機能し、分泌タンパク質の選別輸送に深く関与しているのではないかと考えている。どのような基質となる膜タンパク質を切断しているのか興味深い。

## 2. 研究の目的

ゴルジ体膜に存在しているロンボイドによるタンパク質分解機能が、どのような機構で亜鉛感受性やゴルジ体からの分泌タンパク質の選別輸送に関わっているのか解析を行う事を目的とする。具体的には以下の5点を計画した。

- (1) ゴルジ膜局在性ロンボイドの遺伝子破壊株の表現型解析により、さらに機能を探索する。
- (2) 亜鉛恒常性に関わる液胞膜型輸送体の局在解析により亜鉛感受性の原因を特定する。
- (3) 遺伝子ライブラリーの過剰発現によりロンボイド変異株の表現型を抑制する遺伝子の単離を行う。
- (4) ロンボイドと相互作用するタンパク質の同定と切断部位の同定を試みる。
- (5) 機能未知の動物・植物細胞由来ロンボイドの分裂酵母での発現と機能解析

## 3. 研究の方法

(1) ゴルジ膜局在性ロンボイドの遺伝子破壊株の表現型解析 2重破壊株の作製も行い、単離した破壊株を用いて種々のストレス（各

種塩、高温・低温感受性、飢餓条件での生育・胞子形成能など）に対する影響を広範囲に確認する。分泌タンパク質の分泌量や糖鎖修飾に対する影響の解析はインベルターゼや酸性ホスファターゼを用いて行う。

(2) 亜鉛輸送体は推定も含めて3種類存在するが、これらが *rob1* 破壊株において正常な局在を示すかどうか、GFP-融合タンパク質を作製して局在変化を確認する。

(3) 3種類のライブラリーを用いて、亜鉛感受性やモネンシン感受性の回復を指標にし、ロンボイドと機能的に密接な関係にあるタンパク質群をスクリーニングする。

(4) Spitzの切断領域である「ASIASGA配列」を膜貫通領域に挿入し、人口基質として使用できる系を確立する。

(5) ヒトの推定ロンボイド遺伝子を単離し、分裂酵母を宿主として発現させ、機能を相補するか確認する。

## 4. 研究成果

(1) ゴルジ膜局在性ロンボイドの遺伝子破壊株の表現型解析により、さらに機能を探索する。

2種類のロンボイドがゴルジ体に局在するか確認した結果、共にゴルジ体膜に局在することが分かった（図1）。

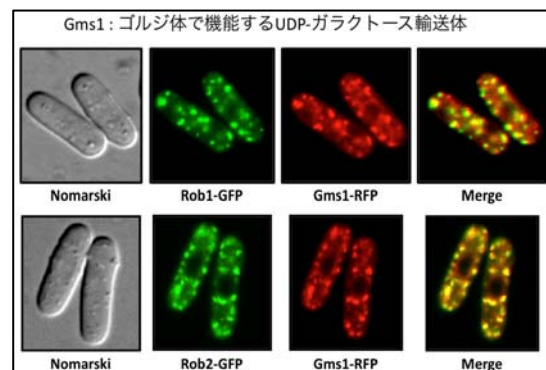


図 1. 2種類のロンボイドはゴルジ体に局在

各遺伝子破壊株を単離し、どのような表現型を示すか不明なため、まずは各種イオンに対する生育への影響を確認した。その結果、*rob1* 破壊株は亜鉛イオンやコバルトイオンに対する感受性を示した（図2）。*rob1* 破壊株がなぜ上記イオンに対して感受性を示すのかは不明だが、Rob1タンパク質の機能解析や周辺で機能するタンパク質を同定する際に、有効な指標として利用できることが分かった。

また、*rob2*破壊株はモネンシンというゴルジ体とエンドソーム間の小胞輸送を阻害する薬剤に対して感受性を示した (図3)。モネンシンに対して感受性を示したことを受けて、液胞への選別輸送にも障害が生じている可能性を確認するため、液胞で機能する

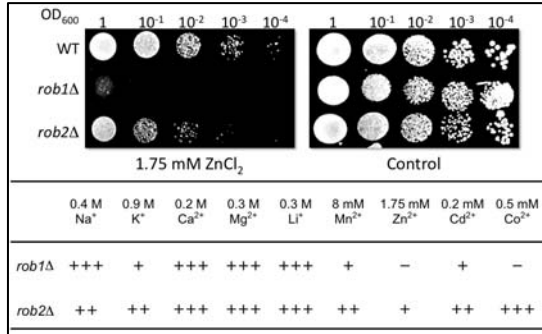


図2. ロンボイド遺伝子破壊株の各種薬剤感受性確認

タンパク質 (カルボキシペプチダーゼ Y: CPY) の漏出をコロニーブロット法により確認した。その結果、予測に反して *rob2Δ* の CPY は正常に液胞に運ばれており、一方で、*rob1Δ* の CPY が細胞外へ漏出していることが分かった (図4)。

二重破壊株はそれらを併せ持った表現型を示したことから、2種類のロンボイドはゴル

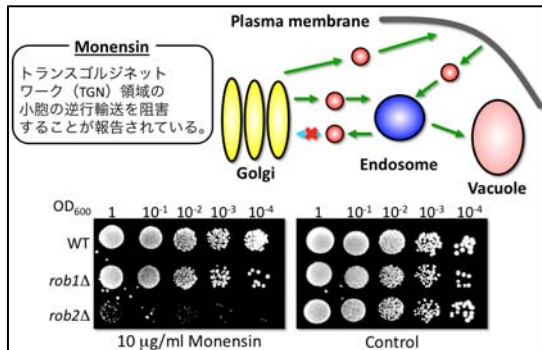


図3. モネンシンに対する感受性の確認

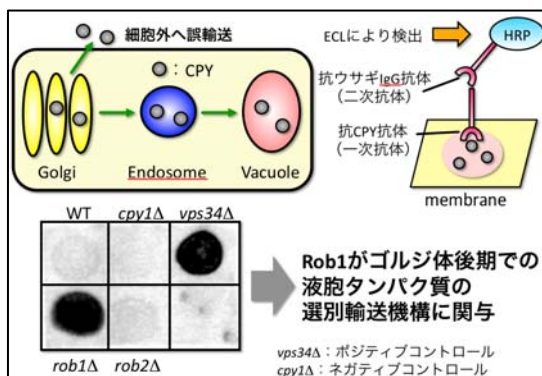


図4. CPY 漏出の確認

ジ体で機能し、各種イオンの恒常性に関わる因子の制御や分泌タンパク質の選別輸送などにおいて、独立した役割を担っているのではないかと考えている。酸性ホスファターゼの糖鎖分子量に変化が見られなかったことから、ゴルジ体における糖鎖修飾機構に障害は無く、細胞外への分泌輸送も影響が無いと考えられる。しかしながら、ゴルジ体における膜タンパク質の切断によって活性化する液胞への選別輸送やイオン恒常性のメカニズムが存在することが強く示唆されたことから、どのような基質が関与しているのか興味深い。

(2) 亜鉛恒常性に関わる液胞膜型輸送体の局在解析により亜鉛感受性の原因を特定する。

液胞型の亜鉛イオン輸送体が過剰な細胞質の亜鉛イオンを液胞内に輸送することで恒常性が維持されていると考えて、亜鉛イオン輸送体の局在観察を試みたが、GFP 融合タンパク質が野生株においても ER 内に凝集体として発現し、正しい局在観察が不可能だった。現時点では、なぜ過剰な亜鉛イオンによって生育障害が生じているのか不明である。取り込み不能、排出不能、隔離不能など様々な要因が考えられるが、ロンボイドとの関連を解析するためには以下に述べる網羅的なスクリーニングをする必要がある。

(3) 遺伝子ライブラリーの過剰発現によりロンボイド変異株の表現型を抑制する遺伝子の単離を行う。

亜鉛感受性の相補を指標にして各種ライブラリーを用いたスクリーニングを行っている。いくつかのポジティブクローンが得られており、再現性を含めて解析を進めている。推定されるプロテアーゼ活性中心変異株や基質認識に関与する部位の変異株等を作製したことから (図4, 5)、これらを用いてスクリーニングを行うことで、周辺で機能するタンパク質が単離されてくることが期待される。

(4) ロンボイドと相互作用するタンパク質の同定と切断部位の同定を試みる。

ロンボイドは複数回膜貫通タンパク質であるため、可溶化の条件を含めて、免疫沈降法の条件検討を行なっている。また、ゲノム情報からのスクリーニングとして、ごく最近、基質となる膜タンパク質の切断領域を低い確率ながら推測できることが報告された

(Mol. Cell, 36, 1048-59, 2009)。これらを元に、23種類の1回膜貫通タンパク質を選抜した。機能未知なものや、選別輸送に關与しているものも含まれており、ロンボイド破壊株でこれらの切断が抑制されているかどうかを確認する予定である。また、この他にも複数回膜貫通タンパク質にも焦点を当てて基質の可能性を探っている。興味深いことにゴルジ体膜に存在する膜結合型転写因子の切断過程に關与していることも分かってきた。本研究成果から継続される研究によって、ゴルジ体を介した新たな細胞機能の制御メカニズムが明らかになることが期待される。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中直孝 (TANAKA NAOTAKA)  
 香川大学・農学部・准教授  
 研究者番号：60324109

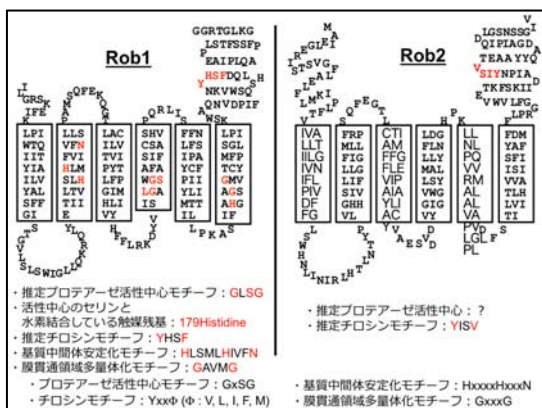


図 4. ロンボイドファミリーに保存されている主要なモチーフ

ロンボイドに普遍的に保存されているモチーフ	Rob1に存在するモチーフ	変異導入	局在	重鉛感受性 相補試験	大腸菌 GlpG
WT			ゴルジ体	+	+
活性中心モチーフ GxSG	GLSG	ALSG GLAG	ゴルジ体 ゴルジ体	- -	- -
活性中心のセリンと水素結合している触媒残基の Histidine	179番目のHistidine	H→A	ゴルジ体	-	-
基質中間体安定化モチーフ HxxxxHxxxN	HLSMLHIVFN	ALSMLHIVFN HLSMLIVFN HLSMLHIVFA	ゴルジ体 ゴルジ体 ゴルジ体	- - -	- - -
膜貫通領域多量体化モチーフ GxxxG	GAVMG	AAVMG GAVMA	ゴルジ体 ゴルジ体	+ -	+ -
チロシンモチーフ YxxΦ	YHSF	AHSF	ER	-	-

(x: 任意のアミノ酸, F: V, L, I, F, M)

この変異導入結果は、大腸菌のロンボイドGlpGの上記のモチーフに変異導入を行ったという報告とすべて一致した。

図 5. Rob1 に存在するモチーフへの部位特異的変異の結果

## 5. 主な発表論文等 [学会発表] (計 1 件)

① 渋谷大介、竹川 薫、田中直孝：分裂酵母のゴルジ体膜で機能するロンボイドプロテアーゼの機能解析、第 82 回日本生化学会大会 (2009 年 10 月 23 日)、神戸 ポートアイランド