

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07354

研究課題名(和文) 出芽酵母のearly, lateゴルジ槽と細胞質膜へ膜蛋白質が局在化される機構

研究課題名(英文) Localization mechanism of yeast membrane proteins to early and late Golgi

研究代表者

野田 陽一 (NODA, YOICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：90282699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母のearly, lateゴルジ体層と細胞質膜へ膜蛋白質が局在化される機構を明らかにするために、N糖鎖、O糖鎖の付加を担う糖転移酵素に代表されるゴルジ体に局在するII型膜蛋白質を対象として解析を行った。今まで解析を行っていなかったマンノース転移酵素Mnt2, Mnt3にタグを付加して、ゴルジ体槽間の分布や、結合する可能性のある蛋白質の探索を行った。その結果、Mnt2, Mnt3のERからの搬出をSvp26が促進することを見出した。また多くの蛋白質のERからの搬出を促進するErv14が、Erv25のゴルジ体からERへの逆行輸送に関与している可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：To gain insights into the localization mechanisms of membrane proteins to early or late Golgi in yeast, we analyzed the functions and localization of type II Golgi membrane proteins. We tagged the Mnt2 and Mnt3, mannosyl transferases whose localization mechanism to the Golgi have not been revealed so far, with 3xHA and analyzed the distribution between early and late Golgi cisternae and sought to find the binding proteins to them. Our analysis revealed that Svp26 functioned as ER exit adaptor of Mnt2 and Mnt3. Similar analyses revealed that Svp26 and Mnn6 facilitated the ER exit of Mnn4.

研究分野：微生物学

キーワード：酵母 小胞輸送 ゴルジ体

1. 研究開始当初の背景

合成された膜蛋白質，分泌蛋白質は，ER 膜に挿入された後，COPII 小胞と呼ばれる輸送小胞に選択的に積み込まれる．COPII 小胞は続いて early ゴルジ槽へ向かい両者の膜の融合に伴い積み荷が early ゴルジ槽へと受け渡される．その後積み荷蛋白質は，ゴルジ体における順行方向の輸送，すなわち early から late 槽方向への輸送過程を経て，後期輸送経路へと運ばれる．このゴルジ体における前方向への輸送は，輸送小胞を介さない「槽成熟」と呼ばれる機構によることが近年明らかとなっている．「槽成熟」は，あるゴルジ槽 (cisterna) が COPI 小胞による逆行輸送系により特定の膜蛋白質を失いつつそれと同時に別の一群の膜蛋白質をやはりまた逆行輸送系により，より後の「槽」から得ていくことにより，「成熟」していく過程である．可溶性の分泌蛋白質や他のオルガネラに向かう蛋白質は逆行輸送されることなく槽に留まり，周囲の構成膜蛋白質が early のものから late のものへ変化していくことにより，見かけ上ゴルジ体の「槽」の間を細胞膜に向かって移動していくことになる．

ER やゴルジ体が適切な蛋白質組成，脂質組成を維持し，本来の機能を発揮するためには，まず early, medial, late の各コンパートメントで働く蛋白質，脂質が，ER からゴルジ体へ COPII 小胞により選択的に輸送される必要がある．また，糖鎖を付加する各糖転移酵素が，糖を付加する順番に従って，ゴルジ槽に正しい順番に並ぶことが通常の糖鎖修飾に重要であることが我々の実験結果からも示唆されている．糖転移酵素のようなゴルジ体膜蛋白質の動的な局在過程において，上記の様に，COPI 小胞による逆行輸送が重要な働きをすることは明らかである．しかし膜蛋白質が，どのようなマシーナリーによって，適切なタイミングで COPII 小胞，COPI 小胞へ積み

込まれるのかなど，基盤となる分子メカニズムに関しては未だ不明な点が多く残されている．

2. 研究の目的

本研究課題では，ER からゴルジ体への輸送，またゴルジ体槽間の逆行輸送，late Golgi 体から細胞質膜への輸送経路における選別輸送の機構に関する新たな知見を得ることを目的とした．

3. 研究の方法

(1) 局在の解析

各蛋白質の局在は，シヨ糖密度勾配遠心により分画したサンプルを，融合したタグに対する抗体を用いて検出することにより解析した．また顕微鏡観察により局在の変化を調べるときは，間接蛍光抗体法と，GFP の蛍光の観察のどちらか，もしくは両方の方法で，各蛋白質の性質により適した方法で解析した．

(2) *In vitro*系による COPII 小胞への積み込み効率の測定

精製したコート成分と，ミクロソーム画分を ATP, GTP の存在化インキュベートして *in vitro* で COPII 小胞を生成した．生成した COPII 小胞に取り込まれたカーゴ蛋白質の量とドナー膜に存在する量との比を計算することにより，COPII 小胞に取り込まれる効率を算出した．野生型株のミクロソーム画分と，*svp26* 遺伝子欠損株などのミクロソームを用いた場合で効率を比較することにより，欠損した遺伝子にコードされる蛋白質が搬出アダプターとして機能しているかどうかを判断した．

(3) 共免疫沈降実験による蛋白質-蛋白質相互作用の解析

ガラスビーズで調製した細胞破碎液を Triton X-100 や digitonin などの界面活性剤

で処理し，遠心後の上清に抗体と Protein A beads を加えて，一晚回転混和した．沈降した蛋白質を SDS-PAGE で分離して，ウエスタンブロッティングで目的蛋白質との共免疫沈降の有無を解析した．

4．研究成果

Mnt2, Mnt3 のゴルジ体局在に関する実験

Mnt2, Mnt3 がゴルジ体に局在することはすでに，その機能，網羅的な解析から知られていたが，ゴルジ体の初期，後期のどこにどのくらい分布しているかは報告されていなかった．そこでそれらの蛋白質の C 末にまず 3HA タグを付加して，免疫学的な方法で early 槽，late 槽を単離するサブコンパートメント法により分布を定量化した．その結果，Mnt2, Mnt3 共に，early ゴルジに約 7 割，late ゴルジに約 3 割存在することが明らかとなった．既知の ER からの搬出を促進する蛋白質をコードする遺伝子の欠損株で Mnt2, Mnt3 の局在を解析したところ，Svp26 が Mnt2, Mnt3 の ER からの搬出アダプターである可能性を見出した．COPII 小胞への積み込みアッセイ，共免疫沈降実験による相互作用の解析などから，予想通り Svp26 が搬出のアダプターであることが強く示唆された．

Mnn4 の局在に関する実験

Kre2 ファミリー蛋白質に属するマンノース転移酵素の幾つかの ER からの搬出が Svp26 により促進される．その解析の過程において *svp26* 遺伝子の欠損で，Kre2 ファミリー蛋白質の一つである Mnn6 の SDS-PAGE における挙動に変化が生じることを見出した．Mnn6 はやはり II 型の膜蛋白質である Mnn4 と共に，N 糖鎖へのマンノースリン酸の付加に関与することが知られていた．そこで Mnn4 の局在や SDS-PAGE での挙動を野生型株，*svp26* 遺伝子欠損株，*mnn6* 遺伝子欠損株で比較したところ，両欠損株で Mnn4 が ER に蓄積することを

示すデータを得た．COPII budding assay や共免疫沈降実験などの結果から，Svp26 と Mnn6 が Mnn4 の ER からの搬出を促進するアダプター蛋白質であることが強く示唆された．

Erv14 と Erv25 に関する実験

Erv14 は多くの膜蛋白質の ER 搬出を促進することが知られている．我々は細胞質膜に局在する GPI アンカー型の蛋白質 Gas1 の局在が *erv14* 遺伝子の欠損により影響を受けることを見出した．Gas1 と Erv14 の相互作用を検出することはできなかったが，GPI アンカー型蛋白質の ER からの搬出を促進する Erv25 と Erv14 が相互作用することを，共免疫沈降実験により見出した．さらに相互作用の pH 依存性を調べたところ，より低い pH，すなわち輸送過程のより後期で強く共免疫沈降することを見出した．さらにシヨ糖密度勾配遠心による分画実験の結果から，Erv14 が Erv25 のゴルジ体から ER への輸送を促進している可能性が示唆された．

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)

{学会発表}(計6件)

難波聖人，足立博之，依田幸司，鎌倉高志，野田陽一：出芽酵母細胞壁 -1,6-グルカン合成関連タンパク質の相互作用の解析．日本農芸化学会 2018 年度大会，2018 年

北澤陽一郎，永田晋治，足立博之，依田幸司，野田陽一：出芽酵母細胞内の -1,6-glucan 分解酵素の探索．酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会，2017 年

東亮介，足立博之，依田幸司，鎌倉高志，野田陽一：出芽酵母の細胞壁 -1,6-glucan の合成に関わる Kre6 の機能に必須なアミノ酸残基の同定．日本農芸

化学会大会 2016 年度大会,北海道 札幌コンベンションセンター, 2016 年

東亮介, 足立博之, 依田幸司, 鎌倉高志, 野田陽一: 酵母細胞壁 β -1,6-グルカン合成に関わる Kre6 の機能に必須なアミノ酸残基の同定.酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 2016 年

Yoichiro Kitazawa, Koji Yoda, and Yoichi Noda: Kre5 of *Saccharomyces cerevisiae* displays a cleavage activity to β -1,6-glucan.Fungal Cell Wall 2015,Institut Pasteur (Paris, France), 2015 年

北澤陽一郎, 足立博之, 依田幸司, 野田陽一: 出芽酵母の細胞中の β -1,6-glucan 切断活性の解析.酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 広島大学, 2015 年

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molbiotech/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

野田 陽一 (NODA, Yoichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 90282699