

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580073

研究課題名 (和文) ゴルジ体「槽成熟」の分子機構

研究課題名 (英文) The molecular mechanism of Golgi cisternal maturation

研究代表者

野田陽一 (Noda Yoichi)

東京大学農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90282699

研究成果の概要 (和文)：

ER-ゴルジ体に局在する Svp26 蛋白質が、N 糖鎖付加で機能するマンノース転移酵素である Mnn2, Mnn5 と、O 糖鎖付加で機能する Kre2 ファミリー蛋白質に属する Ktr3, Kre2, Ktr1 の、ゴルジ体局在を制御する機構を明らかにした。Svp26 にゴルジ体局在が依存しない Ktr4 蛋白質のゴルジ体局在を制御する膜蛋白質を新たに見いだした。またマンノース転移酵素の界面活性剤に対する可溶性が異なることを見だし、ゴルジ体局在と脂質の関連を示唆するデータを得た。

研究成果の概要 (英文)：

We found that Svp26, a yeast ER-Golgi resident membrane protein, is involved in the Golgi localization of the N-mannosyltransferases Mnn2 and Mnn5, and the O-mannosyltransferases Ktr3, Kre2 and Ktr1. We also found the membrane proteins involved in the Golgi localization of Ktr4, whose Golgi localization is independent of Svp26. We found that mannosyltransferases display distinct detergent solubility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能, 出芽酵母, 小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物に普遍的に存在するゴルジ体は、蛋白質組成、脂質組成の相違など生化学的に区別される複数のサブコンパートメントに分

けられ、ER に近い方から early-, medial-, late-ゴルジと称されている。ER から運ばれてきた分泌蛋白質がゴルジ体のサブコンパートメント間を移動していくのは「槽成熟

(cisternal maturation) モデル」によることが長い間議論されていた。「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 cisterna 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。最近、超高速高感度共焦点レーザー顕微鏡による生細胞観察から、「槽成熟」が出芽酵母において実際に起きていることが示され長年の論争に決着がつけられた。これによりゴルジ体のサブコンパートメント間で起きているイベントは COPI 小胞による「逆行輸送」のみであり、その「逆行輸送」における膜蛋白質の選別輸送が正しく起きることが「槽成熟」の中心であることが明確になったといえる。しかしながら、この「選別輸送機構」の詳細は不明である。

我々は以前にゴルジ体の early と late のサブコンパートメントを分けて取得する方法を開発、各コンパートメントに存在する膜蛋白質を MALDI-TOF-MS を用いて網羅的に同定した。その結果複数の機能未知の膜蛋白質を見いだすことに成功した。その中の一つ、我々が Svp26 と名付けた蛋白質は early ゴルジ体に局在する推定 4 回膜貫通型の進化的に良く保存された蛋白質である。遺伝子欠損株では O 糖鎖付加のマンノース転移酵素 Ktr3 蛋白の局在がゴルジ体から ER に完全に移行する。糖転移酵素のゴルジ体での選別輸送を制御する膜蛋白質は、我々の知る限り Svp26 が初めての例である。またマンノース転移酵素は全体の配列に相同性があり、膜に対するトポロジーが同一であるにも関わらず、early と late ゴルジ体に局在するものにきれいに二分されることから、全体の疎水性度や活性の違いに影響されずに逆行輸送にお

ける「選別輸送」を追跡するための非常に良いマーカーになると考えた。

スフィンゴ脂質は「ラフト」の主要膜構成成分として有名であるが、その合成は ER で作られたセラミドを基本骨格としてゴルジ体の early のサブコンパートメントで開始される。その後 medial, late と進むに従い種々の修飾を受けると同時に、大変興味深いことに輸送経路に沿って濃縮されていくことが強く予想されているが、これは逆行輸送小胞のスフィンゴ脂質含量はドナーのゴルジ体膜よりかなり低いという実験結果に基づいている。つまり「槽成熟」の過程でスフィンゴ脂質含量の低い逆行輸送小胞が出芽するのに伴い、残されたゴルジ槽に相対的にスフィンゴ脂質が濃縮され、early から late に向けてスフィンゴ脂質の濃度勾配が形成されることになる。また同じく重要な事実として、細胞質膜に局在する膜蛋白質の膜貫通配列は early ゴルジ体膜蛋白質より平均 5 (哺乳類) ~ 8 アミノ酸 (酵母) 長いことが挙げられる。そしてこのことは、特に出芽酵母においてはスフィンゴ脂質は特徴的に長い脂肪鎖 (C26) を持ち (酵母のグリセロリン脂質の鎖長は C16:0 C18:1) そのスフィンゴ脂質は細胞質膜に最も多く存在し (細胞質膜の全脂質の約 30%)、細胞質膜に「厚み」を与えていることとよく対応している。これらのことは膜貫通領域とスフィンゴ脂質の直接の相互作用や、スフィンゴ脂質が関わる微小膜ドメインとの相互作用の度合いがゴルジ体槽成熟における「膜蛋白質の選別輸送」の重要な基盤である可能性を強く示唆している。

## 2. 研究の目的

以上のような背景のもと、本研究では各サブコンパートメントを特徴づける膜蛋白質であるマンノース転移酵素をモデル膜蛋白質として、逆行輸送経路での選別輸送機構、言い換えるならば「異なるサブコンパートメントで特異的に輸送小胞に取り込まれる分子機

構」を、①選別輸送装置の機能、②スフィンゴ脂質の役割、という二通りの観点から解析することにより、ゴルジ体「槽成熟」の分子機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 遺伝子操作法

すべて *Current Protocols in Molecular Biology* 等の方法に準じて行った。

#### 使用菌株

遺伝子操作は大腸菌 DH5 $\alpha$  株を用いて行った。酵母は、基本的には KA31a をバックグラウンドとする株において遺伝子破壊や、染色体上でのマンノース転移酵素の HA によるタグgingを行い、それらを用いて生化学的な実験や、間接蛍光抗体法による観察を行った。また必要に応じて、BY4741 株と、それをバックグラウンドとする遺伝子破壊株のコレクション (EUROSCARF より購入) も一部の実験において用いた。

#### COPII 小胞出芽アッセイ

(コート成分の精製)

COPII 小胞のコート成分である Sar1, Sec23/24 複合体, Sec13/31 複合体を, Sar1 は大腸菌から, 残り二つは高発現した酵母から調製した。生産株はすべて Randy Schekman 博士から頂き, 精製も彼らの発表しているプロトコールに従って行った。

(ER 膜の準備)

コート成分を含む膜表在性の蛋白質を ER 膜から除くために, 凍結した酵母スフェロプラストから調製した ER 膜に等量の B88+1 M NaCl w/DTT, PMSF, pics を加えて混ぜて, 氷上に 5 分静置する。B88 w/DTT, PMSF, pics で 2 回膜を wash した後, B88 w/DTT, pics and PMSF を加えて homogenizer を用いて均質化した。ここから 10  $\mu$ l 採って 240  $\mu$ l の 2% SDS に混ぜ, OD<sub>280</sub> を計測, そこからタンパク質濃度を求めた。

(出芽反応)

上記の様に洗った ER membrane 250 mg/ml, Sar1 4 mg, Sec23/24 4 mg, Sec13/31 8 mg,

10 mM ATP 60  $\mu$ l, 2 mM GTP 60  $\mu$ l, 400 mM phosphocreatine 60  $\mu$ l, 2 mg/ml creatine kinase 20  $\mu$ l を合わせ, total 200  $\mu$ l になるよう B88 w/DTT, PMSF, pics で調節して出芽反応溶液を準備した。出芽反応溶液を 25 °C で 30 分間 Incubate した。氷上に 5 分間静置した後, ここから 5  $\mu$ l 採って, 2 $\times$ SDS-PAGE sample buffer 5  $\mu$ l を加えて 1 分間 boil, T 画分とした。残りの反応溶液を 10 kprm, 5 min, 4°C で遠心し, その上清 150  $\mu$ l を超遠心にかけて (45 kprm, 1 時間, 4°C, Beckman Coulter TLA55)。上清を捨て 1 $\times$ SDS-PAGE sample buffer 20  $\mu$ l をペレットに加えて, water bath sonicator を用いてペレットを溶解して 1 分間煮沸した。これを S+ (コート成分あり) or S- (コート成分無し) 画分とした。サンプルを SDS-PAGE に供し, 抗 HA 抗体でマンノース転移酵素を検出, Image J で定量を行い, T に対する S の量を計算することにより積み込みの効率を算出した。

#### 免疫沈降

YEPD あるいは SD-ura 培地 10 ml で OD<sub>600</sub>=1.0 まで培養した後, 室温で 5 分間遠心して集菌し, 0.9 ml water で洗浄した。菌体に B88 w/ pics, PMSF, benzamidane を 700  $\mu$ l 加えて懸濁し, 1 g の glassbeads を入れた Multi Beads Shockre 用の tube に移し, Multi Beads Shocker (Yasui Kikai) を用いて細胞を破碎した。上清とビーズを洗った液を合わせて, 未破壊菌体を遠心で除き, 1 / 9 量の 10 % (w/w) digitonin を加えて氷上に 10 分間静置した。10 krpm, 4°C で 5 分間遠心し, その一部を S 画分として回収した。残りの上清に抗 HA 抗体を加え, 低温室で 30 分間回転した後, 0.2 % digitonin で wash した Protein A Sepharose beads を加えて低温室で一晩回転した。遠心の上清 30 一部を採って U (unbound) とし, 残りの上清は捨てた。0.5% digitonin で 4 回 wash した beads に 1 $\times$ SDS-PAGE sample buffer を加えて 1 分間煮沸し, これを B (bound) 画分とした。

S, U, B 画分をウェスタンに供した.

界面活性剤に対する可溶性

HA タグを連結したマンノース転移を発現する酵母を 10 ml の YPD で振盪培養し、OD<sub>600</sub>=1.0 になったところで菌体を集菌 (1,100g、5min、室温)した. イオン交換水で洗浄後、1 mM PMSF、1 mM benzamide、1 µg/ml protease inhibitor cocktail を含む B88 Buffer 700 µl に懸濁した。懸濁液に菌体破碎用ガラスビーズを 1 g 加え、MULTI-BEADS SHOCKER (安井機械) を用いて 1 分破碎を 3 回繰り返した. それぞれの破碎の間には 1 分のインターバルを挿入した. 破碎液を回収し、700 g、4 °C で五分間遠心分離して未破壊細胞を除き、lysate とした. lysate 60 µl に 4x SDS PAGE sample buffer を 20 µl 加えて、Whole cell lysate(W) とした. lysate の残りを 100,000 g、4 °C (Beckman Coulter TLA55) で 1 時間超遠心し、上清を回収した. 上清 60 µl に 4x SDS PAGE sample buffer を 20 µl 加えて、S100 とした. SDS-PAGE にはそれぞれ 10 µl を供し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った.

#### 4. 研究成果

(1) Svp26 は Mnn2, Ktr3 の ER からの搬出アダプターとして機能する.

SVP26 遺伝子の欠損株では、ゴルジ体マンノース転移酵素である Mnn2, Mnn5, Ktr3 が ER に誤局在する. 本来ゴルジ体局在のタンパク質が、ER へ移行する理由としては、①合成された、またはゴルジ体からリサイクリングされたタンパク質の、ER から搬出される効率が下がったため、②ゴルジ体から ER への逆行輸送の効率が上がったため、の二つが考えられる. 前者の可能性について、インビトロの COPII 小胞の出芽系を用いて検討した. Ktr3-3HA, あるいは Mnn2-3HA を発現した野生型株と *svp26* 遺伝子欠損株から ER 膜を調製し、精製した COPII コートタンパク質と ATP, GTP の存在下インキュベ

トして、出芽した小胞画分に含まれる Ktr3-3HA, Mnn2-3HA の量を比較することにより COPII 小胞に積み込まれる効率を比較した. その結果、*svp26* 遺伝子欠損株では、Ktr3-3HA, Mnn2-3HA ともに COPII 小胞に積み込まれる効率が野生型株と比較して顕著に減少していることがわかった. また Mnn2-3HA も以前に見いだした Ktr3-3HA と同様に、Svp26-FLAG と結合することを見いだした. Svp26 自身も効率よく COPII 小胞で運び出されるタンパク質であることから、Svp26 は Ktr3 と Mnn2 の ER からの搬出を促進する機能を持つことが明らかとなり、遺伝子欠損株ではこの搬出の効率が減少することにより Ktr3 や Mnn2 が ER に留まって観察されることが強く示唆された. さらに Ktr3, Mnn2 と、そのゴルジ体局在が Svp26 に依存しない Mnn1 との膜貫通領域を境としてキメラ蛋白質を作製し、野生株、*svp26* 遺伝子欠損株での局在と Svp26 との結合 (免疫沈降) を調べたところ、これらのマンノース転移酵素のルーメン側の領域が Svp26 との結合と Svp26 によるゴルジ体局在に関与することを明らかにした. また最後に逆行輸送を担う COPI 小胞を作り出すコート複合体であるコートマーと Svp26 が結合するかどうかを調べた. Digitonin で可溶化した細胞抽出液から N 末に 3xHA タグを付加した Svp26 を免疫沈降して、コートマーのサブユニットの一つである Sec21 の抗体で結合の有無を検出した. その結果、結合が検出され、Svp26 が COPI 小胞に積み込まれることにより、自身のゴルジ体局在やマンノース転移酵素のゴルジ体局在を維持していることが示唆された.

(2) Svp26 の Kre2 ファミリー蛋白質の局在への関与

Svp26 にゴルジ体局在が依存する Ktr3 は配列の似た蛋白質 9 個からなる Kre2 ファミリーに属している. 他の Kre2 ファミリー蛋白質のうちで Svp26 にそのゴルジ体局在が依存する酵素があるかどうかをまず顕微鏡観

察により調べた。その結果 **Kre2**, **Ktr1** が *svp26* 遺伝子の欠損により ER に移行することを見いだした。**Mnn2**, **Ktr3** と同様に, **Kre2** と **Ktr1** が **Svp26** と結合するかどうかを **Digitonin** で可溶化した細胞抽出液からの免疫沈降実験により調べた。その結果, **Svp26** と **Ktr1**, **Kre2** が共沈することがわかった。しかし, **Svp26** と共沈する **Kre2** の量は, **Ktr1** と比較して非常に少なかった。現在この量の違いの原因, また局在などとの関連があるのかどうか検討している。さらに **Ktr1** と **Kre2** のインビトロでの **COPII** 小胞への積み込みの効率を (1) と同様に, 野生型株の膜と, *svp26* 欠損株の膜を用いた時で比較した。**Mnn2**, **Ktr3** の場合と同様に積み込みの効率は野生型の膜と比べて, *svp26* 欠損株の膜で低下していた。またさらに **Svp26** の高発現株の膜を用いると, **Kre2**, **Ktr1** の **COPII** 小胞への積み込み効率が上昇した。これらことから **Svp26** は **Kre2**, **Ktr1** の ER からの搬出を促進する機能を持つことが強く示唆された。また他の **Kre2** ファミリー蛋白質のうち, マンノースリン酸の転移酵素である **Ktr6** の細胞内の存在量が *svp26* の遺伝子欠損により顕著に上昇していることを見いだした。量が増える原因としては, 遺伝子の転写や翻訳の上昇, タンパク質の分解の抑制などが考えられる。いずれにせよ, *svp26* 遺伝子の欠損, もしくは欠損により引き起こされた糖鎖修飾の乱れを検知して他の糖転移酵素の存在量を変化させるシグナル伝達経路が存在することが考えられる。その詳細な機構や生理学的な意味についての解析を現在行っている。

(3) **Erv41**, **Erv46** は **Ktr4** のゴルジ体局在に関与する

(2) で調べた **Kre2** ファミリー蛋白質の中で **Svp26** にゴルジ体局在が依存しない蛋白質に関して, その ER からの搬出やゴルジ体局在に関与する可能性のある蛋白質を, 既知の **COPII** 小胞に多く存在する蛋白の中から検索した。その結果 *erv41* あるいは *erv46* 遺伝子の欠損で **Kre2** ファミリー蛋白質のひとつ

である **Ktr4** 蛋白質が, ゴルジ体から ER に移行することを見いだした。**Erv41**, **Erv46** はヘテロダイマーを形成することを我々の研究室と他の研究室が過去において独立に報告していたが, その正確な生物学的な機能は明らかではなかった。**Mnn2** 等と同様に **Ktr4** が **Erv41**, **Erv46** と共沈することを見いだしたが, **Erv41**, **Erv46** はヘテロダイマーを形成するにも関わらず, **Svp26** と共沈する **Erv41** と **Erv46** の量には大きな差があった。このことは必ずしも **Erv41** と **Erv46** が等価な機能を有しているのではない可能性を示唆していると考えた。

(4) マンノース転移酵素の界面活性剤可溶性

脂質と膜蛋白質のゴルジ体局在との関係を調べるために, 上記実験で HA タグの C 末への導入により検出を可能にしたマンノース転移酵素と, 抗体の作製や他研究室からの入手により検出が可能なマンノース転移酵素の界面活性剤 **Triton X-100** に対する可溶性の度合いを調べた。その結果, 膜から可溶化される程度はマンノース転移酵素により, かなり異なることを見いだした。可溶性の高い酵素と低い酵素のキメラを (1) の場合と同様に膜貫通領域を境に作製し, それらキメラの **Triton X-100** 感受性を調べたところ, 予想に反して, 界面活性剤感受性はルーメン領域に依存して決まることがわかった。現在ルーメンで界面活性剤感受性が決まる理由, またスフィンゴ脂質合成関連遺伝子の変異株, 欠損株での界面活性剤感受性とゴルジ体局在を調べている。

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 5 件)

① Tomokazu Kurita, Yoichi Noda, Tomoko Takagi, Masako Osumi, and Koji Yoda  
**Kre6 Protein Essential for Yeast Cell Wall -1,6-Glucan Synthesis Accumulates at Sites of Polarized Growth**

**J. Biol. Chem.**, 286, 7429-7438, (2011),  
プレスリリース有り

② Yoichi Noda and Koji Yoda  
Svp26 Facilitates Endoplasmic  
Reticulum-to-Golgi Transport of a Set of  
Mannosyltransferases in *Saccharomyces  
cerevisiae*  
**J. Biol. Chem.**, 285, 15420-15429, (2010),  
プレスリリース有り

③ Yoshinari T, Noda Y, Yoda K, Sezaki H,  
Nagasawa H, Sakuda S.  
Inhibitory activity of blasticidin A, a strong  
aflatoxin production inhibitor, on protein  
synthesis of yeast: selective inhibition of  
aflatoxin production by protein synthesis  
inhibitors.  
**J. Antibiot (Tokyo)** 63, 309-314, (2010)

④ Keisuke Sato, Yoichi Noda, and Koji  
Yoda  
Kei1: a Novel Subunit of  
Inositolphosphorylceramide Synthase,  
Essential for Its Enzyme Activity and Golgi  
Localization,  
**Mol. Biol. Cell.**, 20, 4444-4457, (2009)

⑤ Seisuke Arai, Yoichi Noda, Satoko  
Kainuma, Ikuo Wada, and Koji Yoda  
Ypt11 functions in bud-directed transport  
of the Golgi by l  
inking Myo2 to the coatomer subunit Ret2  
**Curr. Biol.**, 18, 987-991, (2008) , プレス  
リリース有り

[学会発表] (計7件)

①野田陽一, 依田幸司  
出芽酵母 Svp26 はゴルジ体マンノース転移  
酵素 Ktr1 の小胞体搬出アダプターとして機  
能する  
日本農芸化学会 2011年度大会 2011年3月  
27日京都女子大学

②石井美奈子, 野田陽一, 依田幸司  
Kre2ファミリーマンノース転移酵素 Ktr4の  
ゴルジ体局在機構  
日本農芸化学会 2011年度大会 2011年3月  
27日京都女子大学

③石井美奈子, 原武浩, 野田陽一, 依田幸司  
Kre2 ファミリーマンノース転移酵素のゴル

ジ体局在における Svp26 の役割  
酵母遺伝学フォーラム第 43 回研究報告会  
2010年9月9日奈良町センター

④野田陽一・依田幸司  
出芽酵母ゴルジ体膜蛋白質 Svp26 はマンノ  
ース転移酵素の局在に関与する  
酵母遺伝学フォーラム第 42 回研究報告会  
2009年7月29日つくばノバホール

⑤野田陽一・依田幸司  
出芽酵母 Svp26 はゴルジ体マンノース転移  
酵素のルーメン領域を認識し小胞体搬出ア  
ダプターとして機能する  
日本農芸化学会 2010年度大会一般講演 2010  
年3月29日東京大学駒場キャンパス

⑥原武浩・石井美奈子・野田陽一・依田幸司  
Kre2 ファミリータンパク質のゴルジ体局在  
における Svp26 の機能  
日本農芸化学会 2010年度大会一般講演 2010  
年3月29日東京大学駒場キャンパス

⑦野田陽一  
出芽酵母ゴルジ体インヘリタンスの分子機  
構  
日本農芸化学会 2010年度大会シンポジウム  
2010年3月30日東京大学駒場キャンパス

## 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化学研究科・助教

研究者番号: 90282699