

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580105

研究課題名(和文) 逆行輸送小胞による選別輸送のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of selective transport in the retrograde traffic in the Golgi apparatus

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：合成された蛋白質が細胞内輸送経路によりオルガネラに正しく局在化されることは細胞の生存にとって必須のプロセスである。ER、ゴルジ体における選別輸送の機構を明らかにするために、非常に優れた真核モデル微生物である出芽酵母を用いて、遺伝学的、生化学的な解析を行った。我々がゴルジ体に見いだしたSvp26、Erv41-Erv46複合体のERからの蛋白質の搬出レセプターとしての機能を解析し、新たな積み荷蛋白質を同定した。また搬出レセプター候補の複数遺伝子破壊株を作製した。その解析より、選択的なERからの積み荷の搬出が出芽酵母の生育に必須であることを示した。また新たな搬出レセプター候補を見いだした。

研究成果の概要(英文)：It is an essential step for cells that newly synthesized proteins are correctly targeted to the organelles where they function. We performed genetical and biochemical experiments to reveal the mechanisms for selective membrane transport between ER-Golgi using *Saccharomyces cerevisiae*, an excellent model eukaryotic cell. We identified a new cargo for the Erv41-Erv46 complex and found an ER-Golgi recycling membrane protein whose precise function was previously unknown as a new candidate of a cargo receptor protein.

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 小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

ER からゴルジ体への輸送, またさらにゴルジ体における槽成熟は, 正しいカーゴが正しいタイミングで順行輸送, 逆行輸送を行う COPII 小胞, COPI 小胞に積み込まれることにより実現される. 現在までに, その過程に関与する多くの蛋白質が見いだされ, その機能が解析されているものの, カーゴの各輸送ステップでの仕分けの機構の詳細に関しては多くの不明な点が残されている.

2. 研究の目的

我々が見いだしたゴルジ体局在膜蛋白質の機能解析を中心に, 輸送経路における選別輸送の機構の一端を明らかにし, ER-ゴルジ体, あるいはゴルジ体の槽の間の輸送に機能する新たな蛋白質の発見や, 槽成熟におけるゴルジ体各槽における選択的な輸送の機構を明らかにすることを目的とした.

3. 研究の方法

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, 精製は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面性の蛋白質を 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 ml 採って 240 ml の 2% SDS に混ぜ, OD₂₈₀ を計測, そこからタンパク質濃度を求めた. 上記のように洗った ER membrane 250 mg/ml, Sar1 4 μ g, Sec23/24 4 μ g, Sec13/31 8 μ g, 10 mM ATP 60 ml, 2 mM GTP 60 ml, 400 mM phosphocreatine 60 ml, 2 mg/ml creatine kinase 20 ml を合わせ, total 200 ml 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 ml 採って, 2 \times SDS-PAGE sample buffer 5 ml を加えて 1 分間 boil, T 画分とした. 残りの反応溶液を 10 krpm, 5 min, 4 で遠心し, その上清 150 ml を超遠心にかけた (45 krpm, 1 時間, 4, Beckman Coulter TLA55). 上清を捨て 1 \times SDS-PAGE sample buffer 20 μ 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 OD₆₀₀=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 ml 加えて懸濁し, 1 g の glassbeads を入れた Multi Beads Shocker 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 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 画分をウエスタンに供した.

4. 研究成果

(1) ER からの搬出アダプター候補遺伝子多重欠損株の解析

出芽酵母 ER での concentrative transport において, 出芽酵母の ER からの搬出カーゴレセプターのうち, どれが生育の維持に必要なものか, また新たなカーゴレセプターの同定を目指して, カーゴレセプター候補をコードする複数の遺伝子を破壊した株を作製した. *svp26* 遺伝子破壊株から始めて, *svp26* を含めて 8 つのカーゴレセプターの遺伝子を順番に破壊したところ, 得られた 8 重破壊株は温度感受性の生育 (37 °C で致死) を示した. またこの温度感受性の原因を, 破壊した遺伝子の単独の導入により調べたところ, *Erv14* の寄与が大きいことを見いだした. 網羅的な解析から, 多くの蛋白質を担当する *Erv14* の ER 搬出への寄与が大きいことは予想されていたが, 他のアダプター遺伝子との多重破壊により高温で致死になることは初めての知見であった. またさらに今までに機能の不明であった ER-Golgi 体間をリサイクルする膜蛋白質と結合する蛋白質を共沈実験により新たに見いだした.

(2) *Erv41-Erv46* の新規な担当積み荷蛋白質の同定

Kre2 ファミリー蛋白質は 9 つの蛋白質から構成されるが, その 3 つのゴルジ体局在が, *Svp26* に依存することを以前に明らかにした. 本研究では, *Kre2* ファミリー蛋白質のうち, *Svp26* に依存しない蛋白質の, ゴルジ体局在

化機構を明らかにするために、過去に報告されている COPII 小胞に豊富に存在する膜蛋白質のうち、非必須な遺伝子にコードされるものを選び、遺伝子欠損株における Kre2 ファミリー蛋白質の局在を顕微鏡観察により解析した。その結果、Ktr4 蛋白質のゴルジ体局在が、その詳細な機能の不明であった Erv41-Erv46 複合体に依存することを見いだした。生化学的な解析の結果、Erv41-Erv46 複合体は Ktr4 の ER からの搬出を促進するカーゴレセプターであることを明らかとした。出芽酵母での知見から、Erv41, Erv46 の相同蛋白質が動物を含む他の生物でも、糖転移酵素のゴルジ体局在に参与している可能性が高いと考えられる。

(3) 機能未知必須遺伝子産物の解析
必須遺伝子にコードされ ER に局在する機能未知の一回膜貫通型蛋白質が、初期輸送過程で機能する可能性について解析を行った。温度感受性の変異株を作製して、その性質を調べたところ、ER 膜蛋白質、細胞質膜の蛋白質のショ糖密度勾配遠心での挙動に大きな変化が見られた。

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5件)

(1) Yoichi Noda, Takehiro Hara, Minako Ishii, and Koji Yoda, Distinct Adaptor Proteins Assist Exit of Kre2-family Proteins from the Yeast ER *Biology Open*, 3(3) 209-224 (2014) 査読有り, DOI:10.1242/bio.20146312

(2) Yoichi Noda and Koji Yoda. Molecular mechanisms of the localization of membrane proteins in the yeast the Golgi compartments *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77 (3) 435-445 (2013) (Review, 査読あり), DOI:10.1271/bbb.120982

(3) 野田陽一, 依田幸司
「出芽酵母細胞壁 -1,6-グルカン合成の謎を解く」
化学と生物 Vol. 51, No. 6, p383-388 (2013), 査読無し

(4) Tomokazu Kurita, Yoichi Noda, and Koji Yoda. Action of multiple endoplasmic reticulum chaperon-like proteins is required for proper folding and polarized localization of Kre6 protein essential in yeast cell wall β -1,6-glucan synthesis. *J. Biol. Chem.*, 287 (21) 17415-17424 (2012) 査読あり, DOI:10.1074/jbc.M111.321018

(5) 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 (9) 7429-7438 (2011) 査読あり, DOI:10.1074/jbc.M110.174060

[学会発表](計21件)

学会発表リスト

(1) 藤井聖也, 野田陽一, 依田幸司「出芽酵母小胞体からの膜タンパク質の選択的輸送機構の解析」日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 03 月 27 日 ~ 2014 年 03 月 30 日, 東京

(2) 林田光弘, 野田陽一, 依田幸司「出芽酵母細胞壁成分 -1,6-グルカン合成関連タンパク質 Kre9 の解析」日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 03 月 27 日 ~ 2014 年 03 月 30 日, 東京

(3) Yoichi Noda and Koji Yoda, "Distinct Adaptor Proteins Assist ER Exit of Yeast Kre2-family and related Membrane Proteins Involved in Protein Mannosylation" American Society for Cell Biology Annual Meeting 2013, 2013 年 12 月 14 日 ~ 2013 年 12 月 18 日 New Orleans, USA

(4) 野田陽一「出芽酵母におけるマンノース転移酵素のオルガネラ局在化機構」第 86 回生化学会大会(招待講演)2013 年 09 月 11 日 ~ 2013 年 09 月 13 日, 横浜

(5) 林田光弘, 野田陽一, 依田幸司「出芽酵母細胞壁成分 -1,6-glucan 合成関連蛋白質 Kre9 の解析」酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会 2013 年 09 月 08 日 ~ 2013 年 09 月 10 日, 仙台

(6) 小西俊彦, 野田陽一, 依田幸司「出芽酵母細胞壁 -1,6-glucan の合成に関わる遺伝子 *KRE5*, *KRE6* の解析」酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会 2013 年 09 月 08 日 ~ 2013 年 09 月 10 日仙台

(7) 藤井聖也, 野田陽一, 依田幸司「出芽酵母 COPII 小胞膜タンパク質遺伝子の多重欠損株におけるゴルジ体膜タンパク質の局在解析」酵母遺伝学フォーラム第 46 回研究報告会 2013 年 09 月 08 日 ~ 2013 年 09 月 10 日仙台

(8) Yoichi Noda and Koji Yoda, "Distinct Adaptor Proteins Assist ER Exit of Yeast Kre2-family and related Proteins Involved in Protein Mannosylation", 26th

International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology 2013 年 08 月 29 日 ~ 2013 年 09 月 03 日, Frankfurt/M. Germany

(9) 野田陽一, 藤井聖也, 依田幸司, 「出芽酵母の糖鎖修飾に関わる膜蛋白質のオルガネラ局在化機構」酵母細胞研究会第 184 回例会 (招待講演)
2013 年 07 月 12 日東京

(10) Koji Yoda and Yoichi Noda, "ER membrane protein Keg1 is essential for yeast cell-wall -1,6-glucan synthesis through folding and functional localization of Kre6 and Skn1" 30th INTERNATIONAL SPECIALIZED SYMPOSIUM ON YEAST (ISSY2013) "Cell Surface and Organelles in Yeasts: from Basics to Applications", 2013 年 06 月 18 日 ~ 2013 年 06 月 22 日 Stara Lesna, Slovakia

(11) Yoichi Noda and Koji Yoda, "Distinct Adaptor Proteins Assist ER Exit of Yeast Kre2-family proteins to localize in the Golgi", 30th INTERNATIONAL SPECIALIZED SYMPOSIUM ON YEAST (ISSY2013) "Cell Surface and Organelles in Yeasts: from Basics to Applications", 2013 年 06 月 18 日 ~ 2013 年 06 月 22 日 Stara Lesna, Slovakia

(12) 藤井聖也, 野田陽一, 依田幸司, "The Effect of multiple disruption of genes encoding yeast COPII vesicle proteins on the organelle localization of membrane proteins", 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム 2013 年 06 月 8 日

(13) 林田光弘, 野田陽一, 依田幸司, "Analysis of the Kre9 protein involved in the biosynthesis of the cell wall -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*", 第 13 回東京大学生命科学シンポジウム 2013 年 06 月 8 日

(14) 藤井聖也, 野田陽一, 依田幸司 「出芽酵母 COPII 小胞膜タンパク質遺伝子の多重欠損株におけるゴルジ体膜タンパク質の局在解析」2013 年度日本農芸化学会大会 2013 年 03 月 25 日東北大学 (宮城県)

(15) 野田陽一, 依田幸司 「出芽酵母 N 糖鎖のマンノースリン酸付加に必要な Mnn4 蛋白質のゴルジ体局在は Svp26 と Mnn6 蛋白質に依存する」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日福岡マリンメッセ (福岡県)

(16) 野田陽一, 依田幸司 「出芽酵母 N 糖

鎖のマンノースリン酸の付加に關与する Mnn4 蛋白質のゴルジ体局在は Svp26 と Mnn6 蛋白質に依存する」第 45 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 2012 年 09 月 06 日京都大学宇治キャンパス (京都府)

(17) Yoichi Noda and Koji Yoda, "A Novel localization mechanism of yeast mannosyltransferases in the Golgi", V INTERNATIONAL CONFERENCE ON MOLECULAR MECHANISMS OF FUNGAL CELL WALL BIOGENESIS, 2012 年 06 月 06 日 Primosten, Hotel Zora, Croatia

(18) 栗田朋和, 野田陽一, 依田幸司 「出芽酵母の細胞壁多糖、-1,6-グルカンの合成に必須の Kre6 が機能を発揮するには ER の複数のシャペロン様タンパク質の働きが必要である」日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 25 日, 京都女子大学 (京都府)

(19) 野田陽一, 石井美奈子, 依田幸司 「出芽酵母ゴルジ体マンノース転移酵素の小胞体搬出を促進する蛋白質の機能解析」日本生化学会 2011 年度大会, 2011 年 9 月 22 日, 京都国際会議場 (京都府)

(20) 野田陽一, 依田幸司 「出芽酵母 Svp26 蛋白質はゴルジ体マンノース転移酵素 Ktr1, Kre2 の小胞体搬出アダプターとして機能する」酵母遺伝学フォーラム第 44 回研究会, 2011 年 9 月 5 日, 九州大学医学部 (福岡県)

(21) 栗田朋和, 野田陽一, 依田幸司 「-1,6-グルカン合成に必須の Kre6 の折り畳みと搬出には ER のシャペロン様タンパク質が必要である」酵母遺伝学フォーラム第 44 回研究会 2011 年 9 月 5 日, 九州大学医学部 (福岡県)

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