

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23780347

 研究課題名（和文）ゴルジ体膜内在性のロンボイド型プロテアーゼが切断する
基質の同定と機能解析

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）：

ゴルジ体膜に局在するロンボイドプロテアーゼ（ロンボイド）は、機能がほとんど分かっていない。本研究では分裂酵母を用いて機能解析及び基質同定を目的とした。

単離した破壊株 (*rob1Δ*, *rob2Δ*) は様々な表現型を示した。*rob1Δ* は様々な薬剤に対する感受性や、ゴルジ体における液胞タンパク質の選別輸送、液胞融合、コロニー凝集性維持などに障害を示した。*rob2Δ* 株においても特定の抗生剤に対する感受性が現れたことから、両破壊株はゴルジ体において異なる機能を有する事が分かってきた。基質をスクリーニングしている中で、*rob1Δ* 株のみでゴルジ体膜結合型転写因子のゴルジ体膜から核への移行遅延が見られた。切断推定箇所に変異導入を行った結果、P1 位に変異導入したものは切断されず、核移行出来ないことが分かった。さらに、作製した人工基質により、切断機構の詳細が明らかになろうとしている。

研究成果の概要（英文）：

In eukaryotic cells, functions of Golgi-localized rhomboid proteases (rhomboid) have many unknown aspects. Disruptants for two types of rhomboid proteases, *rob1Δ* and *rob2Δ*, showed pleiotropic phenotypes in fission yeast. The *rob1Δ* strain showed sensitivity to drugs, missorting vacuole-type CPY, aberrant colony formation, and so on. The *rob2Δ* strain showed sensitivity to particular antibiotic. We found that one membrane-bound transcription factor (MTF) could not travel to the nucleus from the Golgi membrane in *rob1Δ* strain. Rob1p with mutation for active site also showed the same phenotype. Furthermore, deduced cleavage site of MTF with mutation for P1 position could not be cleaved in wild-type strain.

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	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

近年のゲノム解析の進展に伴って、新しいタイプのタンパク質分解酵素が注目されている。本酵素は膜内在性のロンボイド型タンパク質分解酵素（ロンボイド）と呼ばれ、大きな特徴は複数回膜貫通タンパク質であり、活性中心領域が脂質二重膜に埋め込まれた構造を有する点である。ロンボイドは原核微生物からヒトに至るまで保存されているが、生理的な役割の解明は遅れている。最近になりグラム陰性細菌の菌体密度のセンシング、出芽酵母のミトコンドリアの増殖制御、原虫の感染機構への関与が報告され始めた。しかし、本研究で注目しているゴルジ体膜で機能するロンボイドは、ショウジョウバエ特有の上皮細胞増殖因子の遊離に関与する報告のみである（図1参照）。

分裂酵母には2種類のロンボイド（仮称 Rob1, Rob2）が共にゴルジ体膜に局在している。私達のこれまでの表現型解析の結果から、*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。

2. 研究の目的

本研究では、ゴルジ体膜上でロンボイド破壊株が何を切断出来なくなることで、上記の表現型が現れるのか、基質の同定を行うことを目的とした。

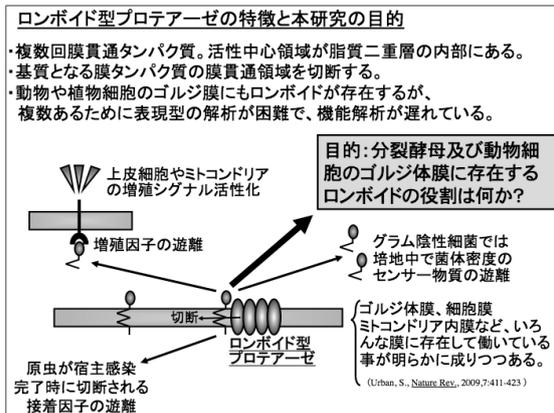


図1. ロンボイドの特徴と目的

3. 研究の方法

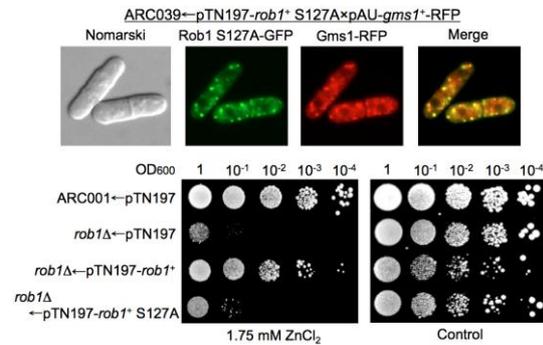
(1) ゴルジ膜局在性ロンボイドが何を切断しているのか、相互作用するタンパク質及び基質タンパク質のスクリーニングと細胞での役割について解析を行う。スクリーニングには2つのアプローチ（遺伝子ライブラリーを用いた網羅的な解析、ゲノムデータベースからの解析）を試みる。

(2) 基質タンパク質の候補の1つである、ゴルジ体膜局在型転写因子の切断機構を解析する。ゴルジ体が膜結合型転写因子の足場として機能している可能性を証明する。

4. 研究成果

(1) ゴルジ膜局在性ロンボイドが何を切断しているのか、相互作用するタンパク質及び標的タンパク質のスクリーニング。

① 遺伝子ライブラリーを用いた網羅的な解析。ゴルジ膜局在性ロンボイド遺伝子破壊株の亜鉛感受性 (*rob1* 破壊株) またはモネンシン感受性 (*rob2* 破壊株) の表現型を利用し、制限酵素の異なる3種類の遺伝子ライブラリーを過剰発現させることで、感受性を相補する抑制遺伝子の単離を試みた。用いる株は完全な遺伝子破壊株ではなく、作製したプロテアーゼ活性中心のみを変異させた変異株（図2）や活性中心のセリンと水素結合している触媒残基のヒスチジン



127番目のセリンはRob1が機能するために必須のアミノ酸である

図2. 活性中心を変異させた Rob1 は亜鉛感受性を相補できない。局在はゴルジ体のままで変化は無い。

を変異させた変異株であり、これらの株を親株としてスクリーニングを試みている。現在までに感受性を相補する株が15株得られており、それぞれの解析を進めている。これらの中には、協調して働くタンパク質や同じ経路で働くタンパク質が含まれている可能性が高い。また、ロンボイドの遺伝子破壊株の新たな表現型探索（小胞輸送、糖鎖修飾、品質管理機構、細胞増殖への影響）も継続した結果、抗真菌剤に耐性を示すことが分かった。これらの表現型に対しても抑制遺伝子の単離を行っている。

② ゲノムデータベースからの解析。ロンボイドの標的となる基質タンパク質は膜1回貫通タンパク質である。基質となる膜タンパク質の切断部位周辺には、細菌や原虫由来のロンボイドの解析により、切断されやすいアミノ酸配列の特徴が挙げられている (Mol. Cell,

36, 1048-59, 2009)。 (尚、本特徴が配列上に含まれていても、基質となりうる可能性は 4 割弱である。) 本情報を元に、24 種類の膜 1 回貫通タンパク質を候補として取り上げ、C 末端側に GFP を融合させたものを作製し、SDS-PAGE により分子量の変化を確認した。これらの内、13 種類は変化が無かった。全ての解析が終わっていないため、継続して確認を行う。しかしながら、候補のタンパク質の中には、ロンボイド破壊株の表現型と同様の機能を示す株が存在しないことから、ロンボイドの基質である可能性は低いと考えている。効率良く基質を探すには、(1)-①が有効であると考え。

(2) 基質タンパク質の候補の 1 つである、ゴルジ体膜局在型転写因子の切断機構を解析する。

(1)-②で述べたスクリーニングを複数回膜貫通タンパク質にも広げた結果、その内の 1 つに膜結合型転写因子 (仮称 MTF) を見出した。本遺伝子は機能未知であるが、N 末側に転写因子を有し、C 末端側に存在する膜 2 回貫通領域でゴルジ体に局在するタンパク質である。本遺伝子の N 末端側に GFP を融合し、*rob1* 遺伝子破壊株で発現させた結果、野生株では核に局在するのに対して、ゴルジ体に局在した状態になることが分かった (図 3.)。

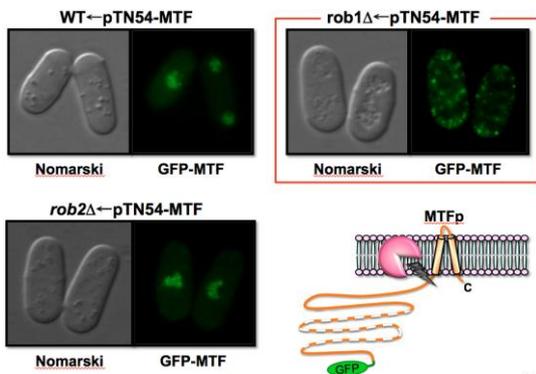


図 3. GFP-MTF は *rob1* 破壊株では核に移行できなくなった。

rob2 破壊株では MTF の局在に変化がないことから、MTF のゴルジ体膜からの切断過程には Rob1 が関与していることが示唆された。切断による分子量の差を SDS-PAGE で検出しやすくするために、推定の核移行シグナルを残したままで、大部分の転写因子領域を削除した MTF Δ8-425 を作製し、確認を行った結果、局在の結果と対応して、*rob1* 遺伝子破壊株では切断されていない分子量の位置にバンドが現れた。一方で、*rob2* 破壊株では変化が無かった (図 4.)。

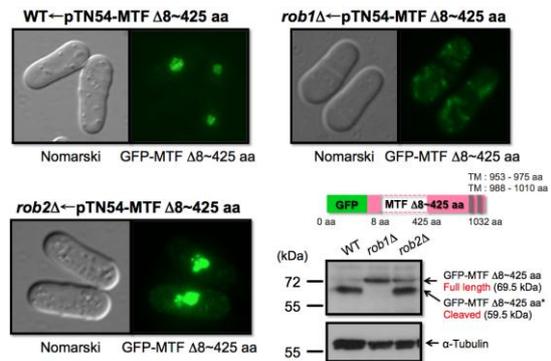


図 4. GFP-MTF Δ8-425 は *rob1* 破壊株では切断されないことが分かった。

次に、Rob1 のプロテアーゼ活性が MTF の切断に関与しているか確認するために活性中心の変異体で同様の解析を試みた結果、何れの変異体も MTF の核移行は抑制され、切断もされないことが分かった (図 5. (a) (b) (c))。

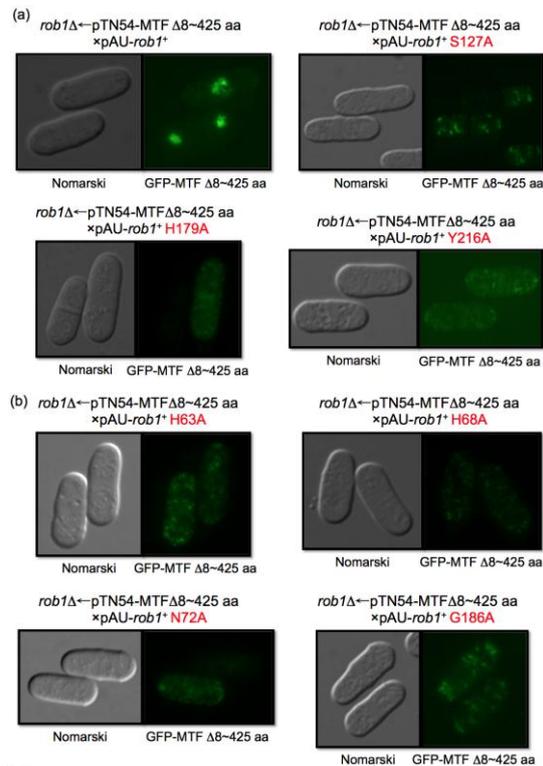


図 5. (a), (b) Rob1 の各種変異体は何れも MTF の核移行を抑制した。(c) 各変異体は GFP-MTF Δ8-425 を切断出来ないことが分かった。

次に、基質である MTF 側の推定切断配列に変異を入れ、野生株で切断されるかどうかを確認した結果、P1 位置に変異が入った場合は、核に移行出来なくなることが分かった (図 6.)。

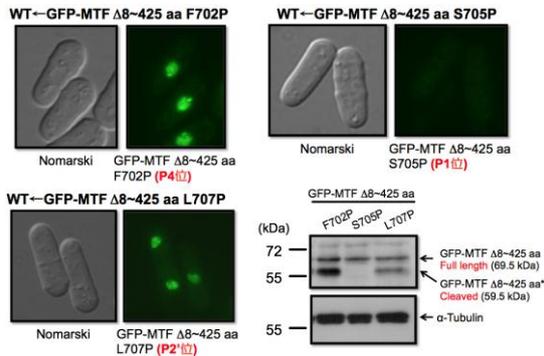


図 6. MTF の推定切断配列の P1 位置に変異が入ると、核移行は抑制された。

以上の結果から、少なくとも MTF は Rob1 の基質の 1 つであり、機能未知の転写因子として機能していることが分かった。

MTF 遺伝子破壊株の表現型をスクリーニングしている中で、特定の抗生剤に対して表現型が出ており、*rob1* 遺伝子破壊株との連関を示唆する結果が出ている。これらの解析により、ゴルジ体膜で機能するロンボイドが関わる生理的役割の解明につながることを期待される。

また、MTF 改変人工基質を用いて、どのタイミングでロンボイドが切断するのか分かってきた。今後は、詳細な切断機構の解析に役立てることで、新たな基質同定に繋がることが期待される。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①東 玲那、渋谷 大介、田淵 光昭、田中 直孝：ゴルジ体膜結合型転写因子の切断に関与するロンボイドプロテアーゼの機能解析、第 45 回酵母遺伝学フォーラム (2012 年 9 月) p56

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