

# マンノース転移酵素のゴルジ体局在化機構に関する研究

野田 陽一

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

## 研究の目的

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)」によることが長い間議論されていたが、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証明された[1] [2]。これによりゴルジ体で起きているイベントのうち、COPI 小胞による「逆行輸送」が蛋白質のサブコンパートメント特異的なゴルジ体局在に特に重要であること、そしてその「逆行輸送」におけるマンノース転移酵素などの膜蛋白質の「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 COPI 小胞への「選別輸送機構」を含むゴルジ体の機能には多くの不明な点が残されている。このようなゴルジ体機能の問題にアプローチするために、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、複数の機能未知の膜蛋白質を見出すことに成功した [3] [4]。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。Svp26 蛋白質は O 糖鎖付加のマンノース転移酵素 Ktr3 と結合すること、またその遺伝子欠損株では Ktr3 蛋白の局在がゴルジ体から ER に完全に移行すること、さらに分泌糖タンパク質が過剰な N 糖鎖修飾をうけることを見いだした[3]。本研究課題では、Svp26 の機能解析を通して、未だ不明の点が多く残る II 型のトポロジーを持つ膜貫通型タンパク質のゴルジ体局在化機構の一端を解明することを目的とした。

## 方法

**インビトロ COPII 小胞形成反応** 小胞を形成させるために必要なコート蛋白質である Sar1, Sec23/24 複合体, Sec13/31 複合体を大腸菌 (Sar1), 酵母 (Sec23/24, Sec13/31) においてそれらを高発現する株から精製した。ER 膜を酵母細胞破碎液からショ糖密度勾配遠心により精製、膜表面に存在する COPII コート蛋白質を除くために 0.5 M の NaCl で洗浄した。ATP, GTP, ATP regeneration system の存在下、洗った ER 膜を精製したコート成分の存在下、非存在下で 25 度でインキュベート、生成した COPII 小胞画分に含まれるマンノース転移酵素を、ウエスタンの後 Image J で定量し、野生型あるいは svp26 欠損株から調製した ER 膜を反応に用いた時の積み込みの効率を比較した。

**免疫沈降実験** Svp26-Flag と HA タグ付きマンノース転移酵素を発現した対数増殖期の

酵母細胞をマルチビーズショッカーを用いてビーズ破碎の後、1% digitonin で可溶化、遠心の上清に抗 HA 抗体と Protein A beads を加えてインキュベート、HA 抗体によるウエスタンブロッティングで Svp26 とマンノース転移酵素の共沈を検出した。

## 結果

### Svp26 蛋白質は Ktr3 と Mnn2 の COPII 小胞への積み込みを促進する

*svp26* 遺伝子の欠損により、本来ゴルジ体局在のマンノース転移酵素である Mnn2, Ktr3 が、ER へ移行する理由として、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可能性が考えられたので、インビトロの COPII 小胞の出芽系を用いて検討した。その結果、*svp26* 遺伝子欠損株では、Ktr3-3HA, Mnn2-3HA とともに 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り、Svp26 が Mnn2 と Ktr3 の ER からの搬出を促進するアダプターとして機能していることが強く示唆された。またマンノース転移酵素の N 末の細胞質側領域、C 末のルーメン領域のどちらかを Svp26 が認識するのかを、キメラ蛋白を作製することにより調べた。その結果、Ktr3, Mnn2 のルーメン領域が Svp26 との結合、Svp26 依存のゴルジ体局在に必要であることが明らかとなった[5]。

### Ktr3 以外の Kre2 ファミリー蛋白質の局在への影響

O 糖鎖の付加に関与するマンノース転移酵素である Kre2 ファミリー蛋白質は、Ktr3 を含む 9 つの相同性を持った蛋白質から成る。Ktr3 以外の Kre2 ファミリー蛋白質の局在を野生株、*svp26* 欠損株において比較したところ、Kre2, Ktr1 蛋白質が、*svp26* 遺伝子の欠損によりゴルジ体から ER へ顕著に誤局在することを見いだした。また Svp26 と Kre2, Ktr1 の共沈実験を行ったところ、共沈が検出され、間接的あるいは直接的な結合が示唆された。また Mnn2, Ktr3 の場合と同様に、Svp26 が Ktr1, Kre2 の COPII 小胞への積み込みを促進するアダプターである可能性を検討するために、インビトロの COPII 小胞出芽実験を行った。その結果、Ktr1, Kre2 共に Ktr3 と比較すると野生型由来の ER 膜を用いた場合でも COPII 小胞への積み込みの効率が非常に低く、Svp26 蛋白質が搬出の効率を上げているかどうか明らかにできなかった。効率が低い理由として、Kre2, Ktr1 蛋白質の COPII 小胞への効率のよい積み込みに必要な何か未知の膜表在性の蛋白質を仮定した。現在塩で洗っていない ER 膜を用いた時の搬出の効率を調べるなどの実験により、その可能性を探っている。

### Svp26 にゴルジ体局在が依存しない Kre2 ファミリー蛋白質のゴルジ体局在を制御する蛋白質の検索

さらに Svp26 に依存しない Kre2 ファミリー蛋白質のゴルジ体局在を制御する蛋白質を、すでに報告のある COPII 小胞に沢山存在する膜貫通型蛋白の中から検索した。酵母遺伝子破壊株のコレクションの中から選択した株に、GFP 融合 Kre2 ファミリー蛋白質をプラスミドで発現して、局在を調べた。その結果、欠損により、Ktr4 蛋白質のゴルジ体から ER への顕著な誤局在を引き起こす蛋白質を見いだした。現在、その蛋白質が Ktr4

の局在を制御する機構を種々の方法で調べている。

## 結論

我々がゴルジ体よりプロテオミクス的な方法により見いだした Svp26 が、一群のマンノース転移酵素のゴルジ体局在に関与すること、また一部のマンノース転移酵素についてはその分子メカニズムを明らかにした。また本研究により、Kre2 ファミリー蛋白質の一つ Ktr4 のゴルジ体局在に関与する蛋白質を新たに見いだした。これらの知見は、オルガネラ局在化機構に関する基礎生物学の新規な知見であり、また将来的には酵母を用いた有用物質生産における基盤技術の進展に貢献することが期待される。

## 参考文献

- [1] Matsuura-Tokita, K, Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K., and Nakano, A.  
Nature 441, 1007-1010 (2006)
- [2] Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J., Glick, B. S.  
Nature 441, 1002-1006 (2006)
- [3] Inadome, H., Noda, Y., Adachi, H., and Yoda, K.  
Mol. Cell. Biol. 25, 7696-7710 (2005)
- [4] Inadome, H., Noda, Y., Kamimura, Y., Adachi, H., and Yoda, K.  
Exp. Cell. Res. 313, 688-697 (2007)
- [5] Noda, Y., and Yoda, K.  
J. Biol. Chem. 285, 15420-15429 (2010)