

平成24年度特別経費（プロジェクト分）
「香川グライコリソース（希少糖・ヒト型糖鎖）を用いたナノ糖質生命科学研究推進事業」
研究グループ別研究成果報告書

研究組織				
研究グループの組織について記述してください。メンバーは教員ばかりでなく、本研究に携わっている非常勤職員・学生も記載してください。				
研究課題名	酵母の糖鎖を介した選別輸送機構の解析			
グループリーダー	氏名	所属・職名	連絡先	
	田中直孝	農学部・准教授	TEL	087-891-3115
			e-mail	本人 秘書 等
			ntanaka@ag.kagawa-u.ac.jp	
メンバー	氏名	所属・職名 (学年)	分担事項・役割等	
	梨子木健人	農学部・修士 2年生	ERGIC で働く Emp34 タンパク質の機能解析	

平成 24 年度研究成果概要

研究成果概要についてわかりやすく記載してください。できるだけ、図を挿入してください。すでに当該年度に外部に発表を行った成果については、研究業績欄の業績番号と対応させてください。なお、本欄は、必要に応じてホームページ上で公開しますので、知的財産に関連する記述等については注意してください。

新生分泌タンパク質はERで輸送小胞に積み込まれ、ゴルジ体を通りながら成熟型糖鎖を形成する。この初期分泌経路において糖鎖はタンパク質の品質管理や小胞への梱包など多岐に渡る重要な役割に関与し、糖鎖とレクチン(糖質結合タンパク質)の相互作用は生命維持のために必須である。初期分泌経路に属するERGIC(ER-Golgi intermediate compartment)の機能は長らく未解明であったが、近年、付加的な品質管理機構や抗原提示への関与が報告され、生体内での重要な役割が明らかにされつつある。分裂酵母Emp43pは細胞内でゴルジ体と隣接し、重ならないドット状の局在を示し、Brefeldin A処理に伴いER exit siteへ濃縮された(図1)。この挙動はERGIC-53と一致しており、分裂酵母を用いて詳細なERGICの機能解析が可能であることが分かってきた。昨年度の結果からEmp43pはC末端に局在化に重要なモチーフ(KYL)を有し、変異導入により局在が変化し、正常にERGICに局在しなければマグネシウム感受性を相補することができないことが分かった。この局在性変化の原因を解析するため、変異導入したEmp43pのBlue-Native PAGEを行った結果、正常な四次構造を形成できなくなっていることが明らかになった(図2)。本複合体の形成に関与するタンパク質を解析するためにERGICの分離精製をスクロース濃度勾配及びフローテーションにより試みたが、ゴルジ体の画分と明確に分離することが出来なかった。そこで、各種emp43変異体のマグネシウム感受性を多コピーで抑制する遺伝子の単離を試み、機能的に関連するタンパク質のスクリーニングを行っている(図3)。また、細胞外へ分泌される酸性ホスファターゼの活性染色が野性株と比較してemp43Δ株では低下していたことから、細胞内外の活性を定量した。その結果、野性株と比較して菌体内に含まれる酵素量が25%上昇し、菌体外(ペリプラズム)に放出された酵素が30%低下しており、emp43Δ株において有意な輸送遅延が生じていることが分かった(図4)。

Emp43pのERGICへの局在化機構や認識するタンパク質の解析を通じて詳細機構を明らかにすることができれば、得られた知見をヒトへフィードバックすることが可能になると考えられる。

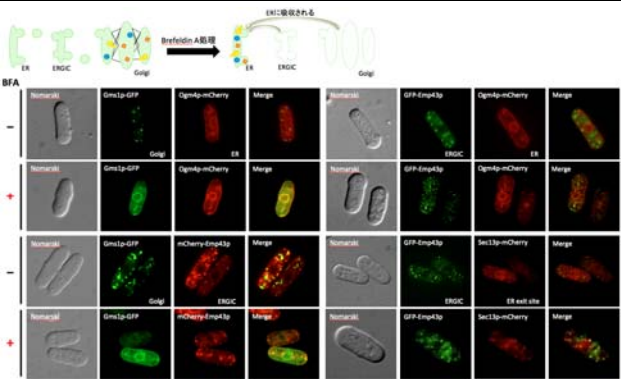


図1 分裂酵母のEmp43pはBrefeldin A処理によりERGIC様区画から、ER exit siteに局在を変化させた。

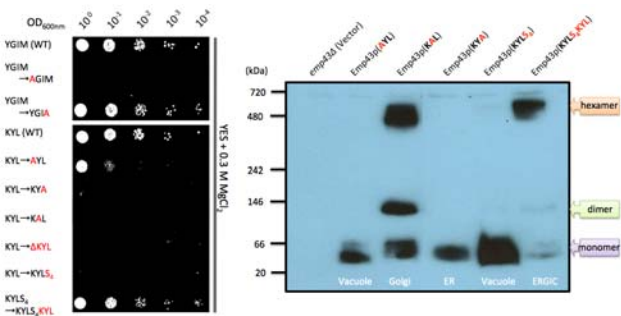


図2 Emp43pのC末端側配列に各種変異を入れると、4次構造が変化し、機能に影響を示すことが分かった。

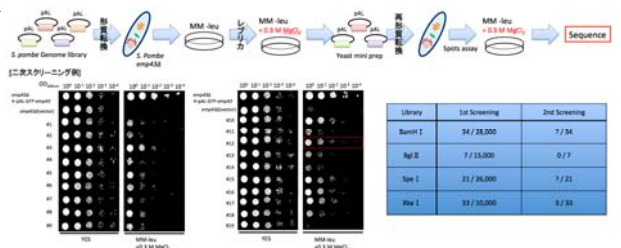


図3 emp43Δ株のマグネシウム感受性を抑制する遺伝子のスクリーニング。各種変異体に対して4種の遺伝子ライブラリーを用いている。

Emp43pのERGICへの局在化機構や認識するタンパク質の解析を通じて詳細機構を明らかにすることができれば、得られた知見をヒトへフィードバックすることが可能になると考えられる。

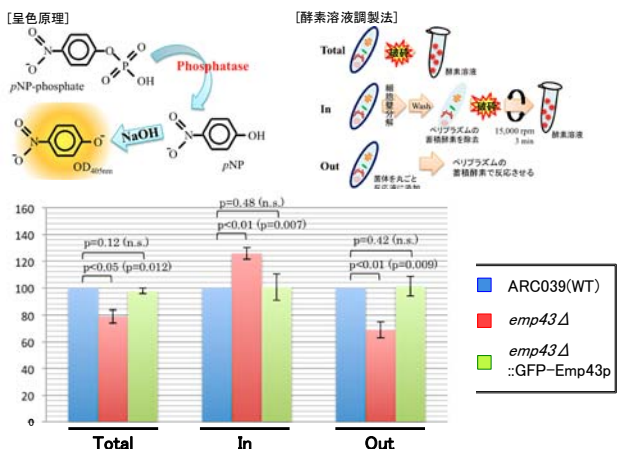


図4 emp43Δ株は糖タンパク質である酸性ホスファターゼの分泌が遅延している。

今後の研究計画

平成 23 年度に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究計画について具体的に記載してください。図を挿入してもかまいません。

遺伝子ライブラリーを用いて、各種変異体のマグネシウム感受性を抑制する遺伝子が同定された場合、局在性の回復や複合体形成への関与などを詳細に解析する。

Emp34p の細胞質側に His tag を挿入したインテグレーション株を単離したことから (図 5)、プルダウンにより相互作用しているタンパク質の同定を試みる。また、ルーメン内のレクチン活性領域の変異体も作製しており、ERGIC 内でどのような分泌糖タンパク質を認識して選別輸送を行っているのか、マグネシウム感受性の抑制を指標に遺伝子ライブラリーによるスクリーニングも行う。

ERGIC 様コンパートメントを經由してゴルジ体へ輸送されるタンパク質のモデルタンパク質として、動物細胞で使用されている水胞性口内炎ウイルス由来タンパク質 VSV-G ts045 が分裂酵母でも使用できることが分かってきた。VSV-G (ts045) は 39°C で立体構造に異常を来し、ER に蓄積する。その後、許容温度に移行した際に通常の順行輸送経路に輸送される。本遺伝子は分裂酵母由来の熱ショックプロモーター及びシグナルペプチド下において、効率良く発現することが分かった (図 6)。可溶性の状態では許容温度下での局在確認が困難であったことから、各種 I 型膜貫通タンパク質の膜貫通領域とのキメラを作製し、ERGIC を通過する過程を可視化する系を確立したい。

また、分裂酵母には L 型レクチンのホモログとして VIP36 ホモログ遺伝子 *vip36⁺* が存在する。私達は *vip36* Δ 株の形態異常と GFP-Vip36 が液胞膜へ局在することを確認している。また、*emp34* Δ との表現型が一部重複していることから、両細胞内レクチンの役割の違いについて解析を進める。

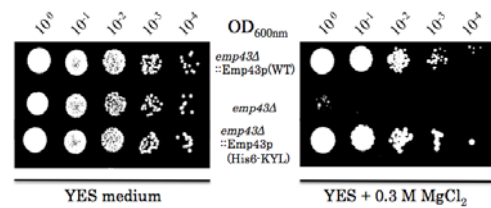
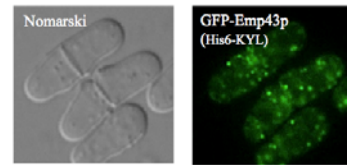
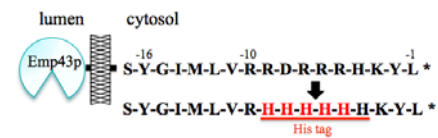


図 5 Emp34-His インテグレーション株の単離

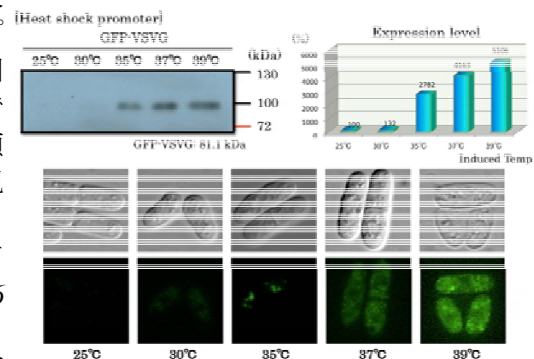


図 6 VSVG ts045 の分裂酵母内での発現

特記すべき事項

本研究に関する受賞 (学生対象の賞も含む)・プレスリリース・大型外部資金獲得につながった等、特記すべき事項があれば記述してください (ささいなことでもかまいません)。本欄は必須ではありませんので、「該当なし。」でも可ですが、できるだけ記載してください。

研究業績

本研究に関連した，[1] 査読がある原著論文（Corresponding Author には*印を付す。），[2] 著書，[3] 招待講演，[4] 学会発表（発表者には○印），[5] 産業財産権（特許等），[6] その他（プロシーディング，査読がない論文，投稿記事等）を通し番号を付して記入してください。本事業の参加者にはアンダーラインを引いてください。記入欄が足りない場合は，用紙を追加してください。なお，本欄は，必要に応じてホームページ上で公開します。

[1] 査読がある原著論文

該当なし

[2] 著書

該当なし

[3] 招待講演

該当なし

[4] 学会発表

1. ○梨子木 健人、鈴木 章太郎、田淵 光昭、田中 直孝：分裂酵母 ERGIC およびマーカートンパク質 Emp43p の機能／構造解析、第 30 回イーストワークショップ（2012. 11） p42