

平成25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

（本報告書は、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。）

| 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 ntanaka@ag.kagawa-u.ac.jp |
| | | | 秘書等 | |
| メンバー | 氏名 | 所属・職名 (学年) | 分担事項・役割等 | |
| | 川口宗馬 | 農学部・4年生 | ERGIC で働く Emp34 タンパク質の機能解析 | |

平成 25 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。

分裂酵母のヒト ERGIC-53 ホモログである Emp43p は C 末端の 3 アミノ酸が ERGIC 様コンパートメントへの局在化に重要であることが分かってきた。アラニン置換による部位特異的変異導入により、K の変異は液胞への誤輸送を示した。また、Y の変異はゴルジ体に、L の変異は粗面小胞体にそれぞれ誤った局在化を示した。Blue-Native PAGE により、複合体の分子量を確認した結果、液胞や粗面小胞体へ局在した変異体は速やかに分解されている傾向が見られ、ゴルジ体に局在化した Y 変異体は約 480 KDa と約 1000 KDa の大きな複合体を保持したまま存在することが分かった。これらの変異による局在変化は、*emp43* 破壊株が示すマグネシウム感受性を相補できなくなることから、細胞質側の KYL 配列を認識する複数のタンパク質が存在し、ERGIC 様コンパートメントへの選別輸送や係留に関与していることが考えられた。Blue-Native PAGE の条件検討により確認された約 1000 KDa の複合体形成に、内腔側の coiled-coil 領域が関与している可能性を確認するため、CC1 から CC3 の各領域の欠失体を作製した (図 1)。特に CC1 欠失体は粗面小胞体への蓄積が観察され、複合体が形成されず、マグネシウム感受性の相補も見られなかった。このことは、coiled-coil を介した複合体が粗面小胞体で形成された後、細胞質側の集合した KYL 配列を認識するタンパク質がリクルートされることで ERGIC 様コンパートメントへ輸送されることを示唆している。

分裂酵母のヒト Vip36 ホモログである Vip36p は遺伝子破壊により銅感受性を示すことが分かった (図 2)。細胞内局在は Emp43p と一致せず、ゴルジ体局在と考えられ、マグネシウム感受性は見られないことから、異なった糖タンパク質の選別輸送に関与していることが示唆された。

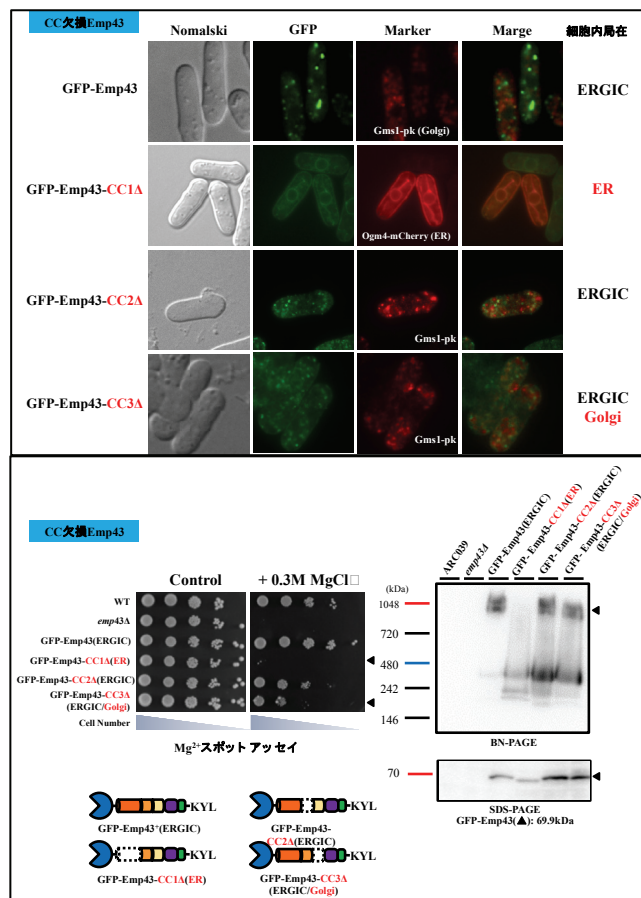
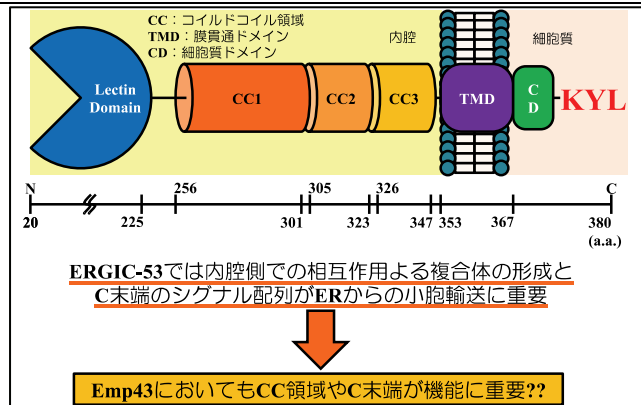


図 1. Coiled-coil を欠失した Emp43 は正常に機能しない。

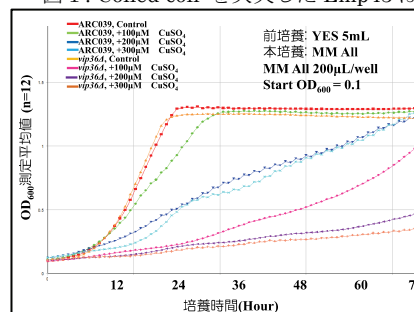


図 2. *vip36* 破壊株は銅イオン感受性を示す。

今後の展望

本事業期間内（平成22-25年度）に得られた研究成果を踏まえ、今後の研究発展の展望について記載してください。図を挿入してもかまいません。

糖タンパク質の糖鎖は自身の安定性や活性化に重要なだけでなく、適した場所に選別輸送される際にも必要とされる。選別輸送の際に受容体となるレクチン様タンパク質は粗面小胞体からゴルジ体にかけて存在し、様々な糖タンパク質を識別し、順行または逆行輸送につなげていると考えられている。動物細胞の実験系でも複数の糖タンパク質が ERGIC-53 や VIP36 の基質として報告されているが、どのように特定の糖タンパク質を識別し、結合や解離を行っているのか、レクチン様タンパク質自身の局在化機構も含めた機能解析となると、依然として多くの不明な点が残されている。

本事業期間にて、分裂酵母には ERGIC 様コンパートメントが存在し、そこではレクチン様タンパク質 Emp43 が巨大な複合体を形成することで局在が可能になっていることが分かってきた。同定できた細胞質側の3アミノ酸およびルーメン内の coiled-coil 領域は、局在や複合体形成において重要な役割を担っており、いずれも欠失や変異によってマグネシウム感受性を示すことが分かった。また、レクチン活性に重要なアミノ酸変異もマグネシウム感受性を示すことがわかった。現在、これら全ての変異体が単離できたことから、マグネシウム感受性を抑圧する遺伝子をスクリーニングすることが可能となった。抑圧遺伝子の解析により、ERGIC 様コンパートメントに局在するために必要なタンパク質群やルーメン内で相互作用しているタンパク質、レクチン活性の基質などが単離できる可能性がある。分裂酵母の Emp43p および Vip36 を解析することで、糖鎖を介した選別輸送の詳細な解析につなげて行きたい。

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,平成25年度中の発表した,[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。

[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. ○川口宗馬、梨子木 健人、鈴木 章太郎、田淵 光昭、田中 直孝 : 分裂酵母の細胞内レクチン Emp43 及び Vip36 の機能解析、日本農芸化学会中四国支部第 38 回講演会 (2014. 1) p29