

平成23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
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 1年生	ERGIC で働く Emp34 タンパク質の機能解析	

平成 23 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。

早期分泌経路であるERからゴルジ体への輸送には糖鎖を介した選別輸送機構が存在する。糖質結合タンパク質であるレクチン様タンパク質は、糖タンパク質の受容体として、ERからゴルジ体への輸送過程に重要な役割を担っている。

高等動物細胞では、ERからGolgiへの輸送途中でER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) と呼ばれるオルガネラを通過するが、その機能や局在しているタンパク質の種類、ERGIC周辺の詳細な輸送系など未解明の部分が多く、オルガネラとしてのはっきりとした役割は分かっていない。

分裂酵母のEmp43pはER型のM-結合型糖鎖マンノースを認識するレクチンとして機能し、マグネシウムイオンの恒常性に関わっていた。顕微鏡観察により細胞内でドット状に光るGolgi様の局在パターンを示したが、シス・メディアル・トランスの何れのGolgiマーカーとも共局在しないことが分かった(図1)。この特徴的な局在は自身のC末端に存在するアミノ酸モチーフが重要な役割を果たすことを明らかにした(図2)。更に、Emp43pが正しくERGIC様コンパートメントに局在することが、マグネシウムの恒常性の維持に重要であることも分かった(図2)。

Brefeldin A (BFA) を処理するとGolgi局在タンパク質はERに吸収され拡散するが、Emp43pはER内へ拡散せずER exit site様の領域へ濃縮された。ヒトのERGICマーカーとして用いられているERGIC-53も同様の挙動を示すことから、分裂酵母にERGICもしくはこれに準ずるコンパートメントが存在し、Emp43pはこのコンパートメントで糖タンパク質の選別輸送に関与している可能性が示唆された。また、酵母破碎液を用いて細胞分画を行うと、このコンパートメントはGolgiと同一の画分に高い頻度で濃縮を受けた(図3)。(研究業績#1, 2, 3)

現在はこの画分から更に分離精製するための条件検討を行うとともに、順行輸送のマーカーとなるタンパク質を用いて、分泌輸送系から本コンパートメントを解析することが可能か検討している。

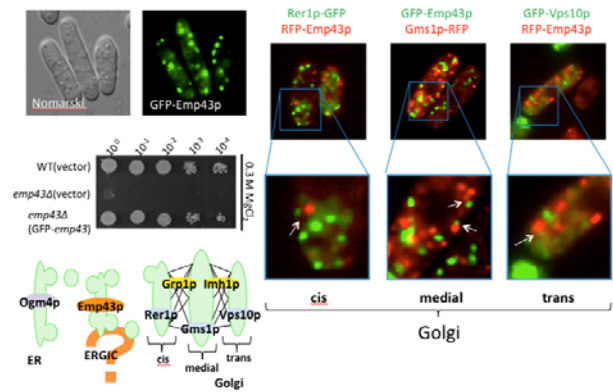


図1 分裂酵母の Emp43p は ERGIC 様区画に局在し、マグネシウムの恒常性に関与していた。

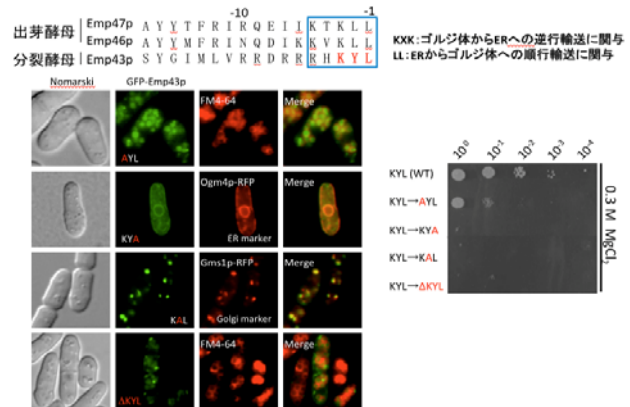


図2 Emp43pのC末端側に ERGIC 様区画への局在化と機能に重要な配列が存在することが分かった。

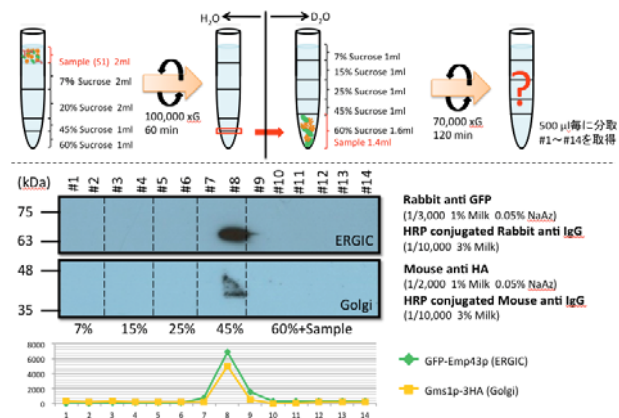


図3 Emp43pの細胞分画にて、シヨ糖密度勾配に続きフローテーションを行ったが、ゴルジ体との差異が出なかった。

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。

引き続き、Emp34p が局在する ERGIC 様コンパートメントの単離条件を詳細に検討する (図 4)。アフィニティークラムなども併用しながら、ゴルジ体の除去を行うことで、ERGIC 画分に含まれるタンパク質を出来る限り濃縮し TOF-MS により同定を試みる。

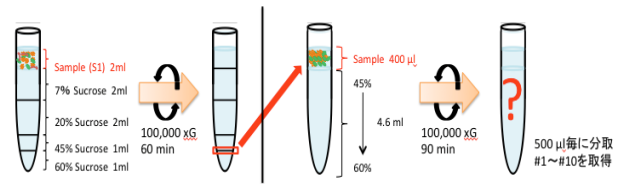


図 4 細胞分画による ERGIC 様コンパートメントの単離

今回明らかになった各種 Emp34 変異体を用いて、ゲノムライブラリーの多コピー発現によるマグネシウムの感受性相補を指標とすることで、Emp34 と相互作用をしているタンパク質や協調して機能しているタンパク質をスクリーニングする (図 5) ことで、マグネシウムの恒常性に関わる基質だけでなく、ERGIC 様コンパートメントへの局在化に必要な関連タンパク質の網羅的な解析を行う。

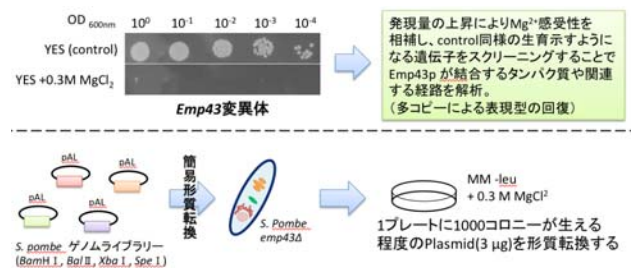


図 5 Emp43 変異体の多コピー抑制遺伝子の単離による機能解

ERGIC 様コンパートメントを経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性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。emp34 破壊株や変異体を利用して ERGIC での糖タンパク質の選別輸送への関与を解析する予定である (図 6)。

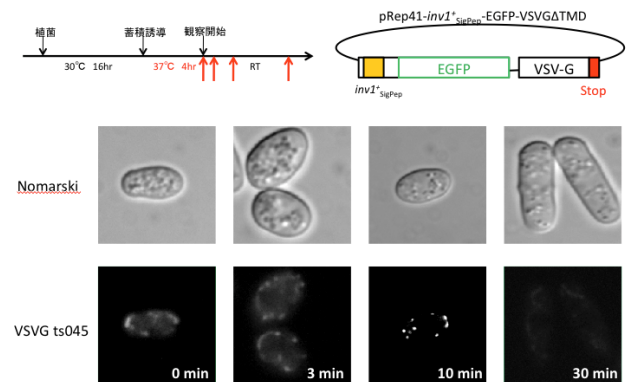


図 6 VSVG (ts045) を用いた ERGIC での糖鎖を介した選別輸送機構の解析

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：分裂酵母の ERGIC 様コンパートメントに局在する Emp43p の解析、日本農芸化学会中四国支部創立 10 周年記念第 30 回大会（2011.5）p37

2. ○梨子木 健人、鈴木 章太郎、竹川 薫、田淵 光昭、田中 直孝：分裂酵母の Emp43p が局在する ERGIC 様コンパートメントの単離と解析、第 43 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会（2011.9）p76