

平成22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	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・4年生	ERGIC で働く Emp34 タンパク質の機能解析	

平成 22 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。

真核細胞（動植物細胞や酵母、真菌類など）において、分泌されるタンパク質の多くは糖鎖が修飾された糖タンパク質である。分泌されるタンパク質は粗面小胞体（ER）内腔で糖鎖を介した品質管理が行われ、正常な立体構造を有する糖タンパク質のみがゴルジ体（Golgi）へと小胞輸送される。さらにゴルジ体内腔では糖鎖の修飾と場合によっては部分的なタンパク質分解を受けた後、成熟した糖タンパク質となってリソソームや液胞、細胞外へと選別輸送される（図 1）。糖タンパク質の糖鎖部分は立体構造の形成過程に重要なだけでなく、適材適所に選別輸送される際に、糖鎖を認識して結合するタンパク質（細胞内レクチン

ン：ERGIC-53、EMP 等）によって正しい分泌経路や回収経路に誘導される為に必須である。

本研究で解析している分裂酵母の細胞内レクチン Emp34p は当初、ゴルジ体のマーカーとして利用を考えていたが（研究業績#1）、真核微生物では初めて、ER と Golgi の中間に位置するコンパートメント（ERGIC）に局在することが分かった（図 2）（研究業績#2, 3）。ER から Golgi への順行輸送を阻害するプレフェルジン処理によって、Emp34p は ER 輪郭にドット状として観察されたことから、ER exit site から ERGIC への輸送機構の詳細な解析も可能であることが分かった。emp34 遺伝子破壊株は Mg²⁺感受性を示し、恒常性に障害を来すことが分かった。動物細胞においても ERGIC の役割は不明な点が多いが、ERGIC-53 の異常による血液凝固第 V・VIII 因子が正常にゴルジ体へ運ばれない病態との関連も報告されており、重要な選別輸送の中継点としての役割が注目されている。

ERGIC の単離も試みており、ゲノム上に相同組換えにより各オルガネラマーカータンパク質を挿入した。ショ糖密度勾配とフローテーションにより ERGIC 様コンパートメントを維持した状態で細胞分画の条件決定を行なっている（図 3）。

より扱いやすい分裂酵母を用いて ERGIC の解析とそこで働く Emp34 の機能を解析することで初期の分泌経路における糖鎖を介した選別輸送機構の詳細が明らかにできると考えている。

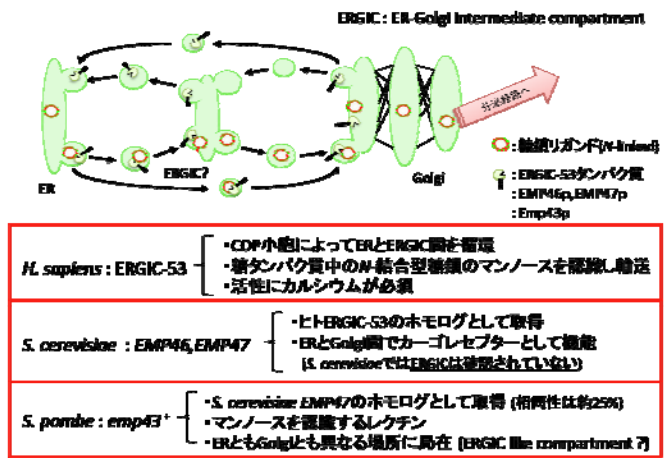


図 1 糖タンパク質の分泌・回収経路と細胞内レクチンの局在と役割

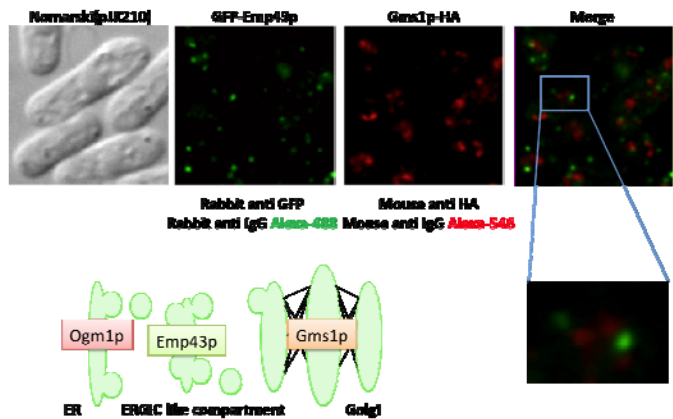


図 2 間接蛍光抗体法による ERGIC 様コンパートメントの局在確認 GFP-Emp43 とゴルジ体マーカーの Gms1-HA を免疫染色した結果、局在が一致しなかった。出芽酵母では ERGIC は確認できないことから、ERGIC の解析は分裂酵母が適していることが分かる。

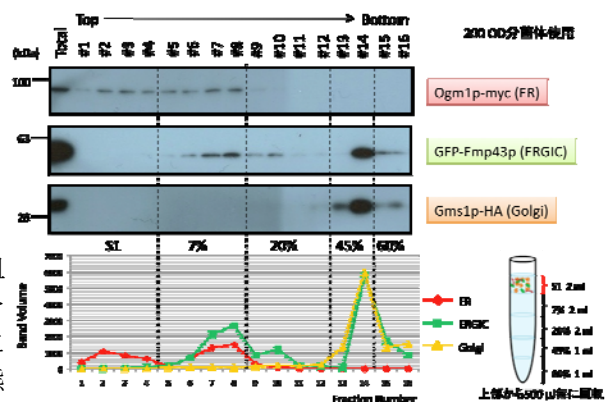


図 3 細胞分画による ERGIC 様コンパートメントの単離

今後の研究計画

平成 22 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。

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)。免疫沈降法なども併用しながら、ERGIC 画分に含まれるタンパク質を TOF-MS により同定する。

CRD 領域の変異体を用いて基質となる糖タンパク質と Emp34 変異体との相互作用を促し、ERGIC 画分からの検出も試みる予定である。

動物細胞で ERGIC の動態観察を行う際に水胞性口内炎ウイルス由来タンパク質 VSVG (ts045) が使われている。分裂酵母で発現できるようにシグナルペプチドを改変し、膜貫通領域にも改変を加えたところ、37°C の非許容温度では ER に蓄積し、そこから 30°C 許容温度に移行させると 10 分後にはドット状として分泌輸送される様子が観察できている。膜貫通領域を Emp43 由来に置換することで、温度変化を利用した動態の解析と ERGIC での糖タンパク質の選別輸送への関与を詳細に解析する予定である。

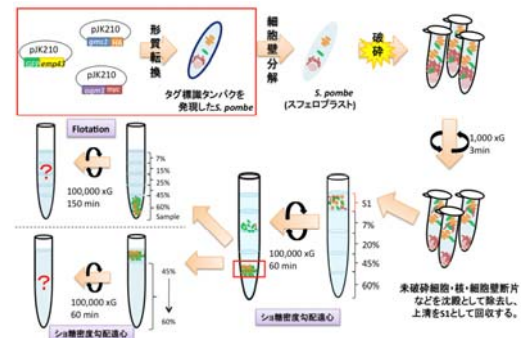


図 4 細胞分画による ERGIC 様コンパートメント

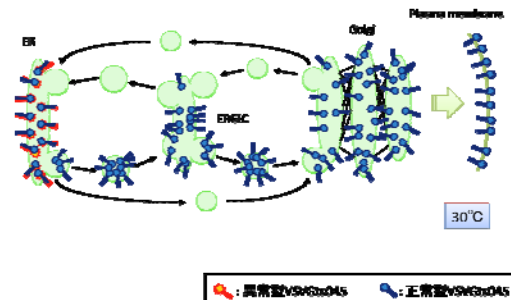


図 5 VSVG (ts045) を用いた ERGIC での糖鎖を介した選別輸送機構の解析

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。

本事業の先行研究 (研究業績#1) に携わっていた愛媛大学連合農学研究科学生である鈴木章太郎君が平成 22 年 3 月、博士 (農学) を取得した。

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

1. Suzuki, S., Matsuzawa, T., Nukigi, Y., Takegawa, K., and Tanaka, N.: Characterization of two different types of UDP-glucose/-galactose 4-epimerase involved in galactosylation in fission yeast. *Microbiology* **156**, 708-718 (2010)

[2] 著書

該当なし

[3] 招待講演

該当なし

[4] 学会発表

2. ○梨子木 健人、鈴木 章太郎、竹川 薫、田中 直孝：分裂酵母の分泌経路に関与知るレクチン様タンパク質の解析、第 43 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会（2010）

3. ○梨子木 健人、鈴木 章太郎、竹川 薫、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、第 28 回イーストワークショップ（2010）