

所 属 (主指導教官)	遺伝子教育研究センター・動物細胞工学部門（河野 憲二教授）		
氏 名	東尾 浩典	提 出	平成12年 7月19日
題 目	小胞体-ゴルジ体間小胞輸送における SEC24ファミリー蛋白質の役割		
要旨 真核細胞において新たに合成された蛋白質は、それぞれに定められた運命に従って、機能すべき目的地に運ばれていく。そのうち、いったん小胞体 (ER) に運ばれたものは、さらに小胞を介した輸送によって様々なオルガネラへと運ばれていく。小胞輸送は、供与膜から輸送小胞が出芽し、受容膜に接着・融合して内容物を渡すという一連の基本反応からなる。ER内腔で修飾を受け正しく折り畳まれた輸送されるべき蛋白質 (cargo) は、COPII (Coat Protein complex II) 小胞によってゴルジ体へと運ばれる。COPII小胞の形成は、Sec23p/Sec24p, Sec13p/Sec31pという二つのコート蛋白質複合体と低分子量GTPaseのSar1pがER膜上でアセンブリーすることにより起こる。この過程では、cargoや小胞上で機能する蛋白質などが小胞に濃縮され、逆に小胞体に留まって機能する蛋白質は小胞から排除される現象が観察されている。近年COPII小胞形成とcargoの選別・濃縮が共役していることが示されたが、どのコート蛋白質がその役割を担うのかまでは明らかでない。本研究の前半では、小胞形成においてもcargo等の選別・濃縮においても役割の明らかでないSec24pの機能を、ゲノムデータベースに存在するSEC24ホモログの機能解析を通じて明らかにすることを試みた。本研究の後半では、SEC24とそのホモログの差異を利用してcargo濃縮機構の解析を試みた。 <u>Sec24pとそのホモログSfb2pの機能的重複と差異</u> 初めに、未だ報告のなかったsec24変異株の表現型を明らかにすることにした。当研究室で当初、核の形態異常を示す温度感受性変異株として取得されたanul (abnormal nuclear morphology 1) 変異株の原因遺伝子はSEC24であった。anul/sec24-20変異株では、制限温度下で核の変形以外にもER膜の異常な伸展が観察された。またER内腔HSP70であるKar2p/BiPが凝集体 (BiP bodies) を形成していた。anul/sec24-20変異株では予想どおり制限温度下でER-ゴルジ体間の小胞輸送の障害が観察され、その程度に応じて上記の異常が増強された。 次にSaccharomycesゲノムデータベース上のSEC24ホモログSFB2 (56% identity) の多コピー発現が、anul/sec24-20株の表現型だけでなくSEC24欠損による致死性をも部分的に抑圧できることを見出した。またSfb2pがSec23pと複合体を形成することもTwo-Hybrid法により示され、Sfb2pはSec24pと同様にER膜からの小胞形成に機能することが示唆された。			

Sec24pとSfb2pの機能の差異を検討するため、*SFB2*の多コピー発現でレスキューされた*SEC24*破壊株 ($\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株)の増殖および小胞輸送を野生株と比較した。 $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株の増殖は、中性条件下で増殖できない、低温・高温で増殖が遅延する、など培養条件依存的であった。 $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株の小胞輸送に関しては幾つかのマーカー蛋白質を用いたパルスチェイス実験により検討した。大部分の蛋白質の分泌は正常であったが、InvertaseおよびGas1pの輸送は著しく遅延していた。これらのcargoの効率的な輸送にはp24ファミリー蛋白質 (type I膜蛋白質) からなるcargo receptorの存在が不可欠である。最近このcargo receptorがCOPII小胞形成途中に生じるSar1p-Sec23p/Sec24p複合体に結合していることが*in vitro*で示され (Kuehn *et al.*, 1998)、この複合体が膜貫通型cargoおよびcargo receptorのCOPII小胞への濃縮に深く関与すると考えられている。このideaに基づくと、Sar1p-Sec23p/Sfb2p複合体のp24 family proteinsに対するaffinityがSar1p-Sec23p/Sec24p複合体のそれよりも弱く、これが $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株におけるinvertaseやGas1pの輸送遅延として現れたのではないかと考えられた。一方 $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株の培養条件依存的な増殖は、温度依存的あるいは非依存的に、中性環境下での生育に必要な蛋白質や他の増殖に必要な蛋白質の輸送が遅延することによりもたらされていると考えられた。このようにSfb2pではなくSec24pでしか輸送できないcargoが存在するという事実は、特定のcargoの輸送に必須なもう一つのSec24pホモログ (Sfb3p/Lst1p)の存在とあわせ、3種の*SEC24*ファミリー蛋白質それぞれがCOPIIコートの構成因子として機能し、異なるcargoの認識および濃縮に関与する可能性を示唆する。またこのことは、野生型細胞において、従来考えられていたような均一なコート成分により均一なCOPII小胞が形成されているのではなく、ヘテロなコート成分によりヘテロなCOPII小胞が形成されている可能性を示唆している。

$\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株の培養条件依存的増殖を利用したcargo濃縮機構へのアプローチ
中性での増殖に必要な因子あるいはそれらの濃縮を促進する小胞輸送関連因子が取得できるのではないかと考え、 $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株が中性条件下で増殖できないことを利用した多コピーサプレッサーの取得を行った。その結果、*SEC22*を取得した。Sec22pは正しい受容膜を認識するための小胞側の因子v-SNAREsの一員であり、*in vitro*の実験から、小胞体-ゴルジ体間をサイクルしつつゴルジ体から小胞体への逆行性小胞輸送に機能することが報告されている (Spang and Schekman, 1998; Cao and Barlowe, 2000)。Sec22pの過剰発現は $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株の増殖障害を回復させただけでなく、Gas1pの輸送遅延をも回復させた。Gas1pなど幾つかのcargoのゴルジ体への輸送は逆行性小胞輸送の障害で間接的に影響を受けることが知られているが、 $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2 μ]株には逆行性小胞輸送の障害は認められなかった。なぜ、逆行性小胞輸送には障害がないのにv-SNARE Sec22pの過剰発現がcargo特異的な輸送遅延を回復させるのか?、という問いに対し現在たてている仮説を述べたい。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 東尾 浩典

真核生物のタンパク質細胞内輸送を理解することは、タンパク質の選別輸送やオルガネラの形成、細胞内情報伝達を理解するうえでも、また有用タンパク質の分泌生産等への応用にとっても重要である。本論文は、真核生物の小胞体からゴルジ体へのタンパク質輸送の最初のステップである小胞体膜での輸送小胞形成において、輸送小胞構成タンパク質であるSec24pとそのホモログがどのような機能的役割を担っているかを詳細に検討したもので、以下の成果をあげている。

1) 本研究室で取得された*sec24*温度感受性変異株を用いて、未だ報告のなかった*sec24*変異株の表現型を明らかにした。*sec24*変異株は、制限温度下で核の形態異常に加え、小胞体の異常な伸展・増加を示した。小胞体ーゴルジ体間の小胞輸送の障害や、小胞体シャペロンBiPの凝集体 (BiP body) 形成等も観察された。これらの表現型は、すべて輸送小胞形成の阻害により起こる現象と一致した。

2) 酵母のゲノムデータベースには、*SEC24*ホモログとして*SFB2*, *SFB3(LSH1)*が機能未知遺伝子として登録されていたので、これらの遺伝子が*sec24*遺伝子破壊株の致死性を抑圧できるかどうかを調べた。*Sfb2p*の過剰発現は、*sec24*欠損株の致死性を回避できること、大部分のタンパク質の分泌を回復すること、*Sfb2p*はSec24pと同様にSec23pと複合体を形成できること、などの知見から*Sfb2p*もSec24pの機能を代替できることが初めて明らかとなった。さらに*SFB2*遺伝子も正常に発現していることから、小胞体から出芽するCOPII輸送小胞は、それまで考えられていたSec23p-Sec24p複合体からのみ形成されているのではなく、Sec23p-*Sfb2p*もCOPII輸送小胞形成に加わっていること、すなわちCOPII小胞はヘテロな小胞からできている可能性が高いことを初めて示した。

3) $\Delta sec24$ [*SFB2*, 2μ]株では、大部分のタンパク質の分泌は野生株と同様のレベルまで回復していたが、いくつかのタンパク質輸送には著しい遅延が認められた。このことから、Sec24pはCOPIIの小胞形成能だけではなく、ある種のタンパク質を効率よく輸送させるために必要な機能も担っていることを初めて示した。

以上のように本論文は、小胞体からの分泌小胞形成におけるSec24p関連タンパク質の機能を詳細に解析し、それらの機能を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。