

論文の内容の要旨

Study of cisternal maturation of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母におけるゴルジ体槽成熟機構の研究)

氏名 石井 みどり

[序論]

ゴルジ体は、*cis* 槽、*medial* 槽、*trans* 槽と呼ばれる数枚の扁平な袋 (槽) からなり、新たに合成されたタンパク質が小胞体からゴルジ体の *cis* 槽に入り、修飾、選別され、*trans* 槽から最終目的地へと送り出される膜交通のキーステーションである。ゴルジ体に常在するタンパク質は後の時期の槽から前の時期の槽へと逆行輸送されることによって、ゴルジ槽は *cis* 槽から *trans* 槽へと徐々にその性質を変えていく (槽成熟、図 1)。この槽成熟によって積み荷タンパク質は *cis* 槽から *trans* 槽へと運ばれて行く。しかしどのように槽成熟が起こるのか、その分子機構は明らかではなかった。そこでゴルジ体の槽成熟を担う機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

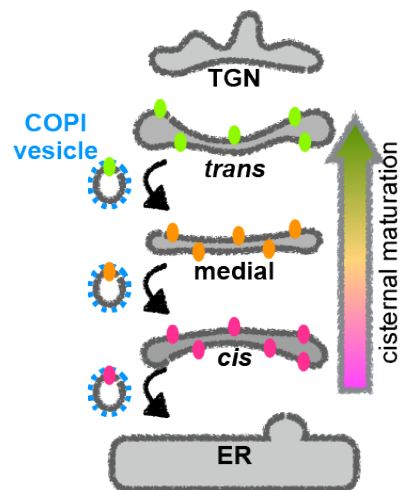


図 1. ゴルジ体の槽成熟

[結果と考察]

出芽酵母のゴルジ体槽成熟過程のライブイメージング

ゴルジ体のタンパク質輸送を明らかにするため、高い時間分解能と解像度を同時に達成する超高速高感度共焦点顕微鏡 (SCLIM) を用いた生細胞観察を行った。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ゴルジ体が層板構造を取る他の生物と共通に保存されたタンパク質がゴルジ体で機能しているにもかかわらず、各槽が細胞内に分散し層板構造を取らないため、一つの槽だけを光学顕微鏡で観察することができる。はじめにゴルジ体マーカータンパク質の検討を行い、異なる時期を標識することのできる一連のゴルジ体常在膜タンパク質セットを確立した。これらのゴルジ体マーカータンパク質を SCLIM で観察し、ゴルジ体の槽成熟を詳細に解析した結果、時期の異なるゴルジ体マーカータンパク質が槽成熟の過程でドメインを形成し、徐々に槽の中のタンパク質が入れ替わっていく様子が観察された。また、ゴルジ体の同じ時期の槽同士が融合や分離をする様子も観察された (図 2)。

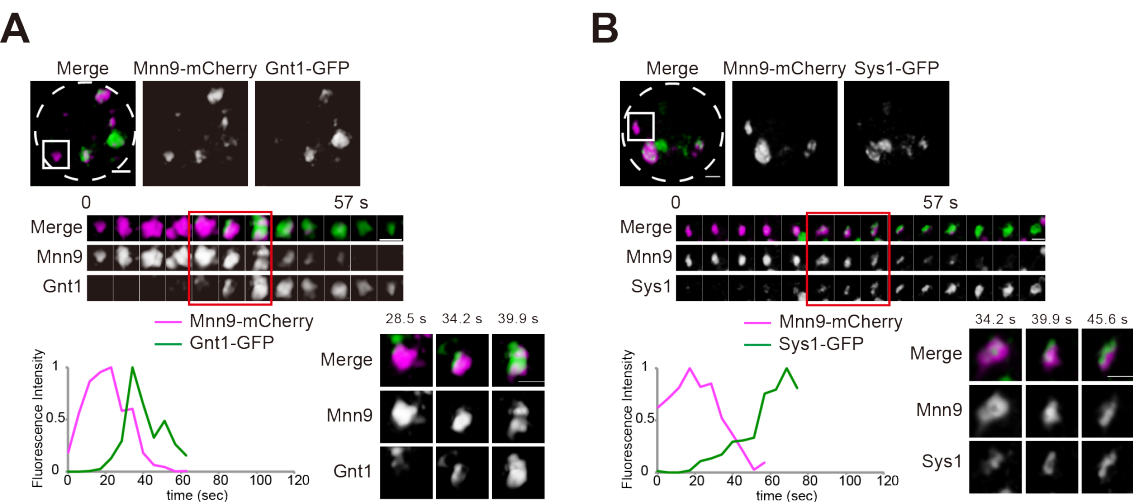


図 2. ゴルジ体槽成熟のライブイメージング
A. cis 槽 (Mnn9)、medial 槽 (Gnt1)、 B. cis 槽 (Mnn9)、trans 槽 (Sys1) マーカータンパク質の観察。

α -COP 温度感受性変異体において槽成熟はほとんど起こらない

ゴルジ体のタンパク質輸送を担うと考えられる COPI 被覆小胞の槽成熟における機能を調べるために、COPI のサブユニットである α -COP の温度感受性株 (*ret1-1*) を用いて COPI タンパク質の機能を阻害した。制限温度 38°C で 10 分間処理し観察を行うと cis 槽から trans 槽へのゴルジ体の成熟がほとんど観察されなかった (表 1)。

	WT		<i>ret1-1</i>	
temperature (°C)	25	38	25	38
matured cisternae	0.70 (12/17)	0.60 (15/25)	0.62 (13/21)	0.11 (5/45)

表 1. 野生型および *ret1-1* 細胞におけるゴルジ体が成熟した割合

オーキシン誘導デグロン法を用いた COPI の機能阻害によって槽成熟が阻害される

COPI の機能をさらに確かめるためオーキシン誘導デグロン (AID) 法を用いて COPI サブユニットの Ret1 または Sec21 タンパク質の機能阻害を行った (COPI-aid 細胞)。その結果、温度感受性変異体を用いた実験と同様に *cis* 槽から medial 槽、および *cis* 槽から *trans* 槽への槽成熟がほとんど観察されなかった。これらの結果より COPI タンパク質が担うゴルジ体常在タンパク質の逆行輸送機構はゴルジ体槽成熟において重要な役割を担っていることが示された (図 3)。

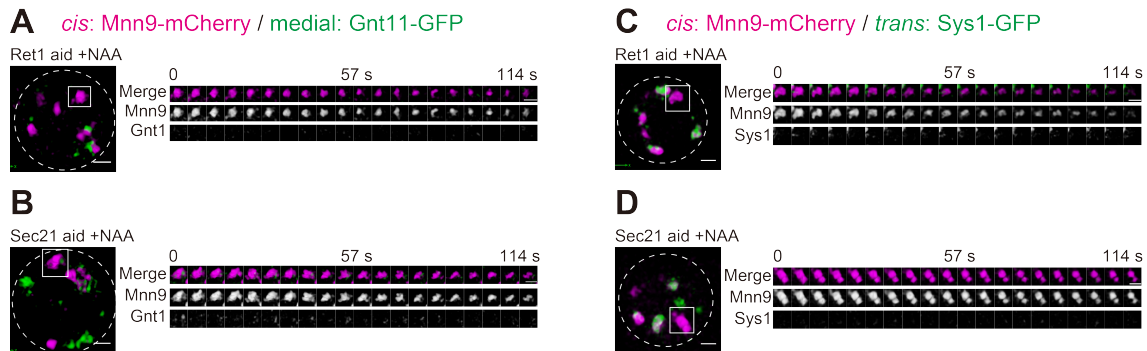


図 3. COPI-aid 細胞におけるゴルジ体の観察

A. Ret1-aid、B. Sec21-aid 細胞における *cis* 槽 (Mnn9)、medial 槽 (Gnt11) マーカートンパク質の観察。C. Ret1-aid、D. Sec21-aid 細胞における *cis* 槽 (Mnn9)、*trans* 槽 (Sys1) マーカートンパク質の観察

COPI タンパク質はゴルジ体の動態に関わる

COPI タンパク質の機能阻害条件において観察を行った結果、槽成熟が止まるだけではなく、ゴルジ体のダイナミクスが著しく低下している様子が観察された (図 4)。これまでまったく知見のなかったゴルジ体のダイナミクスに関して、本研究において初めてゴルジ体における膜交通機構がゴルジ体の動態に重要であるということが示唆された。

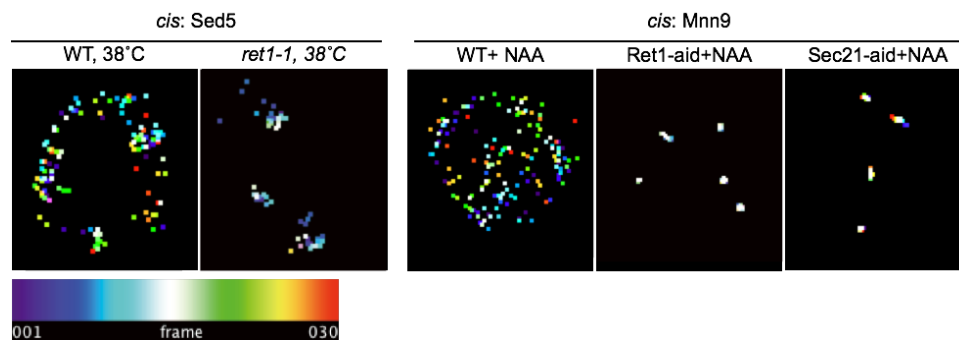


図 4. *ret1-1* 変異体および COPI-aid 細胞におけるゴルジ体の重心プロット

野生型細胞、*ret1-1* 変異体の 38°C 条件における *cis* 槽 (Sed5)、および野生型細胞、Ret1-aid、Sec21-aid 細胞の NAA 点か条件における *cis* 槽 (Mnn9) の 30 タイムポイント分の重心をプロットした。各点はタイムポイントごとに左下に示す色で表示。

COG 複合体の各サブユニットの機能

COPI 小胞はどのように選択的に運ぶべき槽を認識し輸送されるのかを調べるため COPI 小胞のゴルジ体膜上での繫留複合体としてはたらく COG 複合体について、サブユニットごとの相互作用を共免疫沈降法において調べた。その結果 COG サブユニットは細胞質中では 8 量体で存在し、膜画分では 8 量体および様々なサブコンプレックスを形成していることが明らかとなった。また、COG 複合体のサブユニットをミトコンドリア外膜タンパク質である Fis1 に融合し、ミトコンドリア上に異所的に発現させると Cog1, 3, 6 において他の COG のサブユニットがミトコンドリアに局在する様子が観察されたが (図 5)、ゴルジ体から運び出された小胞がミトコンドリアに局在する様子は蛍光顕微鏡および細胞分画法では確認できなかった。この結果から、COG 複合体は SNARE など標的膜に局在する他のタンパク質と協調して小胞の繫留を行っており、COG 複合体だけでは小胞を安定して繫留することはできないと考えられる。

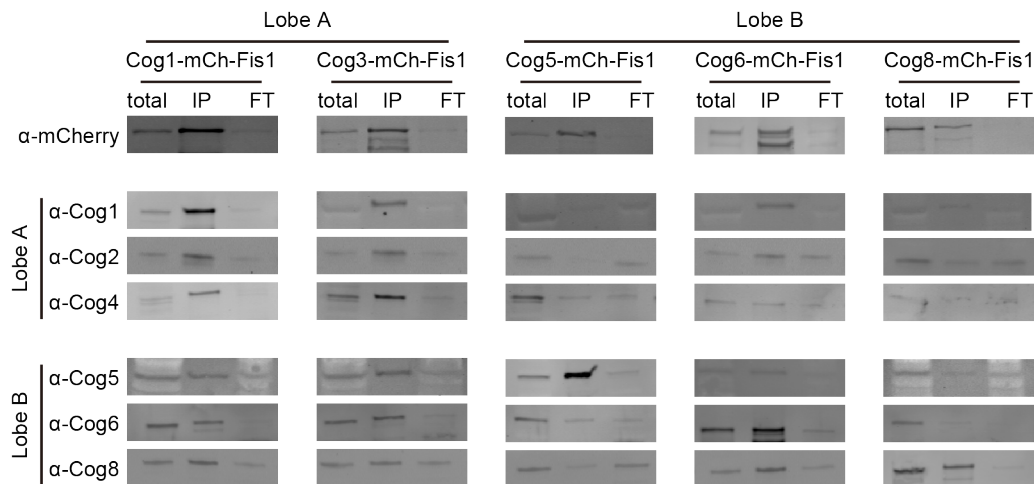


図 5. ミトコンドリア外膜に異所的に発現させた COG サブユニットは他のサブユニットをミトコンドリアに局在させる

Cog1, 3, 5, 6 および 8-mCherry-Fis1 発現細胞において mCherry 抗体で免疫沈降し、他のサブユニットとの結合を共免疫沈降法において調べた。Cog1, 3, 6-mCherry-Fis1 は他のサブユニット安定に結合する足場として働くことができる。