

真核細胞内における小胞輸送は、輸送小胞と呼ばれる小さな膜小胞を介してオルガネラ間で生体分子のやりとりを行う物質輸送システムである。小胞体においては、COPII コートと呼ばれるコートタンパク質複合体と低分子量 GTPase である Sar1 によって COPII 小胞と称される輸送小胞が形成される。さらに、Sec16 と呼ばれる足場タンパク質がこれらの因子を統合して、小胞体膜上に小胞体出口部位と呼ばれるサブドメインをつくり、この場所で COPII 小胞の形成が行われると考えられている。このような COPII 小胞形成の動態については、電子顕微鏡による固定されたスナップショットという静止した情報しか得られておらず、この反応に関わるタンパク質因子群の COPII 小胞形成過程におけるダイナミクスについての知見は少ない。本論文は、出芽酵母における小胞体からの COPII 小胞形成反応を、顕微鏡下に形成させた人工脂質平面膜上に再現し、この反応に関わる因子群を蛍光標識することにより、個々の因子の時空間的な動態を可視化して解析するとともに、小胞体からの輸送小胞形成の分子メカニズムについて広く考察したものである。

本論文は、第 1 章：序論、第 2 章：材料と方法、第 3 章：結果、第 4 章：考察、第 5 章：参考文献から構成されている。小胞体から形成される COPII 小胞は、直径が 60~80nm 程度であり、一般的な光学顕微鏡の空間分解能を下回るため、この反応に関わる各因子の動態を直接可視化することは難しい。そこで本論文では、膜厚を大きくした人工脂質平面膜を用いることにより、形成された COPII 小胞が膜からくびり切られるのを防ぎ、平面膜上で COPII コートを二次元的に連結させて、COPII コート/積み荷タンパク質からなる光学顕微鏡で観察可能なミクロンサイズのクラスターを形成させている。このクラスター形成を COPII コート集合のモデルとして、COPII 小胞の形成に関わる因子群の動態の解析を行っている。

まず、COPII 小胞形成開始のトリガーであり、COPII コートを膜上に繫留するために必須と考えられている Sar1、および COPII コートのサブユニットである Sec13/31 を蛍光標識して、COPII コート/積み荷タンパク質クラスターの形成過程におけるこれらの因子の動態を可視化した。その結果、Sec13/31 はクラスター全域に渡って均等に局在しているのに対して、Sar1 はクラスターの辺縁部にしか局在していないことが明らかとなった。この結果は、COPII コートの膜への繫留には Sar1 が必要であるという定説とは異なり、Sar1 は COPII コートを連結・伸長させていく時にのみ膜上に局在して、その後 Sar1 は GTP を加水分解して速やかに膜から解離するという新たなモデルを示唆するものである。また、

Sar1 が膜上にリクルートされるためには、**Sar1** に対するグアニンヌクレオチド交換因子である **Sec12** が膜上に必要であるが、**Sec12** を蛍光標識して可視化したところ、**COPII** コート/積み荷タンパク質クラスター中には取り込まれず、また **Sar1** が局在するクラスターの辺縁部にも濃縮されていないことから、**Sar1**-**Sec12** 間の相互作用は一過的なものであることが明らかとなった。さらに、**COPII** コート/積み荷タンパク質クラスター形成の過程における **Sec16** の動態を可視化したところ、**Sar1** の GTP 加水分解サイクル依存的に **Sec16** が **COPII** コート/積み荷タンパク質クラスター中に取り込まれることが示され、小胞体出口部位の形成機構の解明に重要な知見がもたらされた。

以上をまとめると、論文提出者は本研究において、小胞体での **COPII** 小胞形成過程における各因子の動態の解析を行い、**COPII** コートが **Sar1** によって制御されながら膜上で連結されていく分子メカニズムを明らかにした。また、本研究における結果は、小胞体における小胞体出口部位の形成に重要な **Sec16** の動態についても重要な知見を提供し、細胞内輸送の分野において有意義な貢献をするものと認められる。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものであると認める。