

液胞および液胞膜タンパク質の局在化における液胞酸性化の重要性

学生証番号 116359 生命応答システム分野 松本理佐

指導教官 大矢禎一

【序論】

植物や菌類の細胞に存在する液胞は単層の膜で囲まれたオルガネラであり、タンパク質の分解やイオン・代謝物の貯蔵、解毒などの生理的機能を果たしている。液胞は動物細胞のリソソームに相当する細胞内で最も酸性化されたコンパートメントであり、その酸性化には液胞膜に存在しているプロトン輸送性 ATP 加水分解酵素 (V-ATPase) が重要な働きをしていることが知られている。出芽酵母において液胞は細胞体積のおよそ 30% を占めており、液胞が酸性 pH に維持されていることは液胞に存在する加水分解酵素の活性の維持、液胞内腔へのイオンやアミノ酸の輸送に必要である。さらに出芽酵母ではグルコース飢餓や培地の pH 変化などの外界の生育環境の変化によって液胞の pH が変化することから、生理的条件下における液胞の酸性化を介した液胞機能の調節が行なわれていることが示唆されている。

液胞だけでなく、多小胞体 (MVB) と呼ばれるエンドソームも酸性化していることが知られており、これら酸性コンパートメントの酸性化は液胞に存在する幾つかのタンパク質の局在にも影響を与えることが明らかになっている。液胞に局在するカルボキシペプチダーゼ Y (CPY)、プロテイナーゼ A (PrA)、カルボキシペプチダーゼ S などの加水分解酵素は MVB を経て液胞へと輸送されるが、阻害剤を使った実験から酸性コンパートメントの酸性化が抑えられると加水分解酵素の局在が液胞からエンドソームや細胞外へと変化することが知られている。しかし網羅的な解析はなされておらず、酸性コンパートメントの酸性化が液胞や液胞膜タンパク質の局在にどのように影響するかについては全体像が把握できていなかった。酵母プロテオームの解析などから、液胞にはおよそ 90 個の液胞および液胞膜タンパク質が局在する事がわかっている。そこで本研究では、V-ATPase の活性を特異的に阻害するコンカナマイシン A (conCA) を用いて、酸性コンパートメントの酸性化を抑えた時に液胞および液胞膜タンパク質がどのように局在変化するかを明らかにすることにした。

【結果・考察】

I. 薬剤処理条件の決定 conCA の濃度を振って酵母の増殖を調べたところ、10 nM、30 nM、100 nM で、それぞれ 5%、20%、50% の増殖阻害が見られ、100 nM 以上 conCA の濃度を増やしてもそれ以上の増殖阻害がみられなかった。そこで、3つの条件 (10 nM で一晩処理、30 nM で 4 時間処理、100 nM で 1 時間処理) で細胞を処理することにした。

II. conCA による酸性化の抑制 細胞内の酸性コンパートメントに蓄積することが知られているキナクリンで染色することにより液胞の酸性化を調べた。細胞を conCA で処理したところ、液胞酸性化能力を欠く変異株 ($\Delta vma5$) と同様に、上記 3つの条件全てで液胞の酸性化が抑えられていることが確認できた。

III. 局在観察結果 液胞に局在することが知られている 90 個のタンパク質について、その GFP 融合タンパク質の局在を観察した。まず、Huh ら (2003) が報告している GFP コレクショ

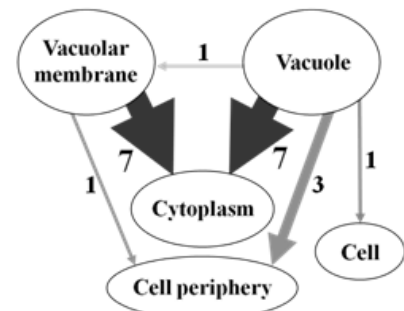


図1: 19タンパク質による20種類におよぶ局在変化

ンを用いた網羅的局在解析の再現性を確かめたところ、一致度は73%と低く、不一致が19%、不明瞭なものが8%と相違が多く見られた。次に全体の90個のタンパク質のうち、局在が液胞もしくは液胞膜に局在している73個のタンパク質について、conCA処理による局在変化を調べた。その結果73個のうち26%を占める19個のタンパク質で局在変化が確認された(図1)。液胞タンパク質と液胞膜タンパク質に分けて局在変化を調べたところ、液胞タンパク質では27個のうち41%(11個)が局在変化し、液胞膜タンパク質では46個のうち17%(8個)が局在変化を示した。したがって、液胞膜タンパク質よりも液胞タンパク質で局在変化が頻繁に見られることが分かった。

先行研究で局在変化が報告されていた3種類の加水分解酵素のうち、CPYとPrAについてGFP融合タンパク質の局在変化を確かめた(図2)。その結果酸性化を抑えると脱局在することがわかり、同時にGFP蛍光像の形態パラメータを用いて定量的に脱局在の様子を表すことができた。

局在変化が見られた19個のタンパク質を調べたところ、この中にV-ATPase複合体のサブユニットが含まれていることがわかった。そこでV-ATPase複合体の構成因子の挙動を調べたところ、今回解析した4つのV-ATPase構成因子のうち、Vma4pとVma13pは細胞質へと脱局在しているが、Vma1pとVph1pは酸性化を抑えても相変わらず液胞膜に留まったままであることがわかった(図3)。この結果から、酸性コンパートメントの酸性化を抑えると液胞や液胞膜タンパク質の複合体が解離するのではないかと考えて、他のタンパク質複合体においても構成因子の挙動を調べることにした。液胞および液胞膜に局在する73個のタンパク質は15個の複合体のサブユニットを含んでいる。酸性化を抑えるとその中の3つ(V-ATPase、EGO complex、PAS complex)で複合体の解離が示唆された。液胞膜上に局在して液胞膜の量を調節するEGO complexでは4つの構成因子のうち、Sna1pのみが液胞膜から細胞質へ脱局在しており、複合体の解離が示唆された。また液胞膜上に局在して液胞膜脂質を合成するPAS complexでは、Vac14pが脱局在することがわかった。また局在変化が見られたタンパク質全てが複合体を形成しているわけではなく、複合体を形成していないタンパク質の中にはMVBを介した液胞への輸送を担うタンパク質が3つ(Sna3p,Vps60p,Vps68p)存在していた。

以上のように、酸性コンパートメントの酸性化は多くの液胞および液胞膜タンパク質の局在化に関与しており、複合体として分子集合するために重要な役割を持っているとともに、MVBを介した液胞へのタンパク質輸送に影響を与えていることが示唆された。

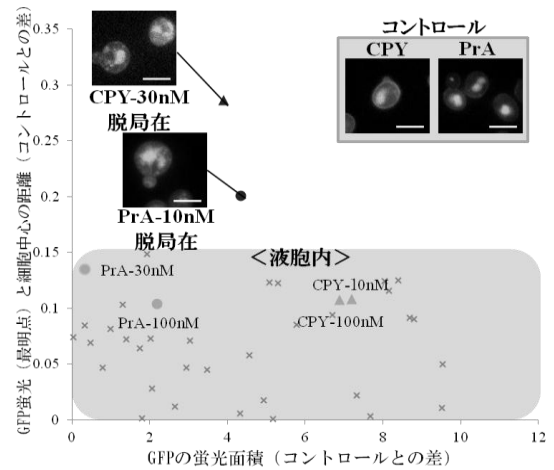


図2. 加水分解酵素の脱局在

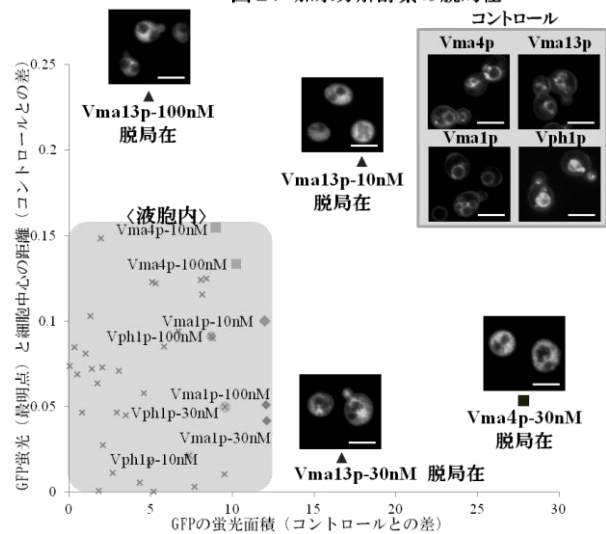


図3. 酸性抑制時におけるV-ATPase複合体の解離