

論文の内容の要旨

論文題目

Functional analysis of Sec23 homolog Nel1 in *Saccharomyces cerevisiae*

(出芽酵母におけるSec23ホモログNel1の機能解析)

氏名 小寺千絵

真核細胞において、小胞体からゴルジ体を経て細胞外に分泌されるタンパク質は、小胞輸送と呼ばれる仕組みによってオルガネラ間を輸送されている。出発地点となるオルガネラから、積荷タンパク質をとりこんだ直径50-100 nmほどの、被覆タンパク質に覆われた膜小胞が形成され、細胞質中を移動し、到着地点となるオルガネラの膜と融合することにより、膜成分と小胞の中身を受け渡す。小胞輸送経路の出発点となる小胞体からゴルジ体へと向かう Coat protein complex II (COPII)小胞の形成過程では、低分子量GTPase, Sar1が決定的な役割を果たしている。

Sar1は真核生物に広く保存されており、欠損させると致死となる。COPII小胞の形成過程において、Sar1は被覆タンパク質Sec23/24およびSec13/31の膜へのリクルート、膜の変形、小胞への積荷の取り込み、小胞のくびりきりなど、様々な場면을制御している。この時、Sar1は小胞体に局在するグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)であるSec12と、被覆タンパク質のコンポーネントでGTPase活性化タンパク質(GAP)であるSec23の働きにより、GDP結合型とGTP結合型をサイクルする。このSar1のGTPaseサイクルがCOPII小胞形成において重要であることが知られており、特に小胞へとりこむ積荷の選別や濃縮に関わることが近年明らかとなっている。

Sar1のGAPであるSec23は、多くの生物において、配列相同性の高いSec23A, Bの2つが保存されている。これまでの研究からA, Bは共にCOPII小胞の形成に関わるが、とりこむ積荷の種類に応じて使い分けがあるのではないかと考えられている。しかし、細胞にとって

2つのSec23ホモログを持つ意義は詳細には明らかにされていない。出芽酵母においても、Sec23と相同性の高いYhr035wというタンパク質が存在している。Yhr035wはSec23とアミノ酸配列で21%の相同性、37%の類似性を持ち、Sec23のGAP活性に必須であるアルギニン残基も保存されている。しかしながらこれまで一切の解析がなされていない未知因子である。本研究ではNel1と命名したYhr035wの機能解析を行うことにより、細胞における2つのSec23ホモログの使い分けの分子メカニズムや、複数のSec23ホモログが存在することの生理的意義に関してより詳細な知見が得られると考えた。

はじめに、Nel1がSec23と冗長な因子かを確認するため、*sec23*温度感受性変異株にNel1を過剰発現させ制限温度下で生育が回復するかを調べたが、回復は見られなかった(Fig. 1)。

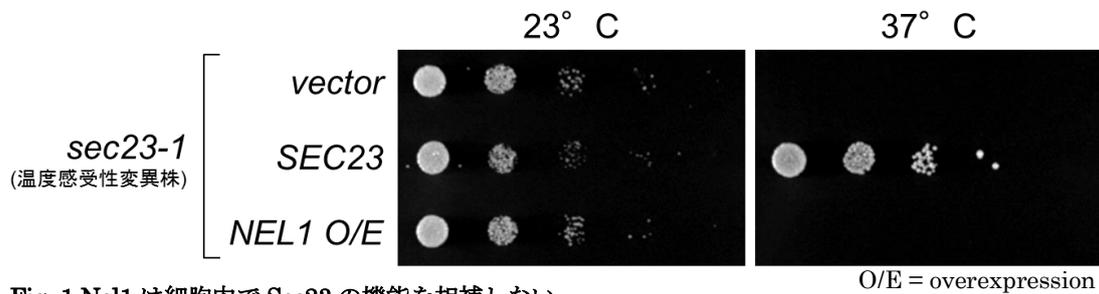


Fig. 1 Nel1 は細胞内で Sec23 の機能を相補しない

さらに、Sec23を細胞内で過剰発現させると酵母の生育が阻害されることが知られているが、Nel1を過剰発現させても影響は見られなかった。これらのことからNel1は細胞内でSec23とは異なる機能を有していることが示唆された。また、Sec23はSec24とヘテロダイマーを形成するが、Yeast Two Hybrid法およびpull down法を用いて解析したところ、Nel1は細胞内でSec24およびそのホモログと安定的には結合していないことが明らかになった(Fig. 2)。

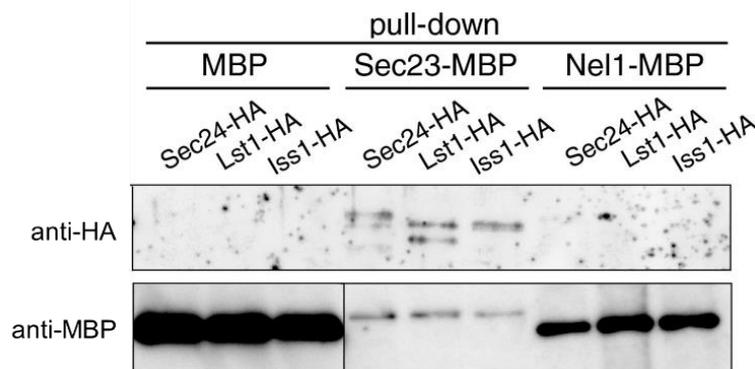


Fig. 2 Nel1 は Sec24 ホモログと結合しない

次に、Nel1がSec23と同じくSar1に対するGAP活性を持つかを調べるため、Nel1精製系の構築を試み、Nel1-MBPを酵母細胞から高純度で精製することに成功した。得られたNel1-MBPはSar1に対して非常に強いGAP活性を示した(Fig. 3)。一方、Nel1において、Sec23のGAP活性に必須であるアルギニンと相同の592番目のアルギニン残基をアラニンに改変したNel1-R592A-MBPで同様の測定を行ったところ、GAP活性は完全に消失した(Fig. 3)。このことから、Nel1もSec23と同様の仕組みでSar1のGTPase活性を促進していることが示唆された。

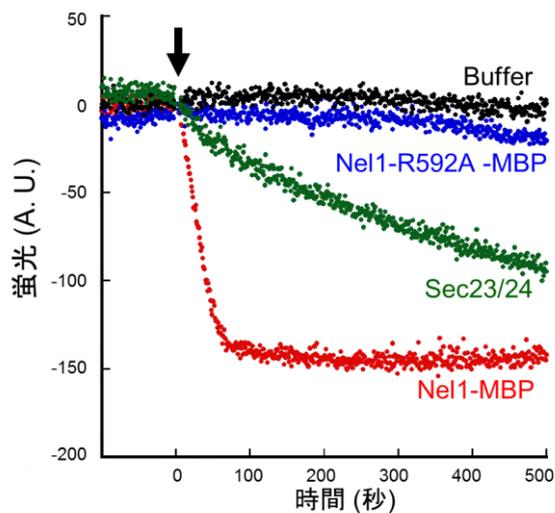


Fig. 3 Nel1 は Sar1 に対する強い GAP 活性を持つ

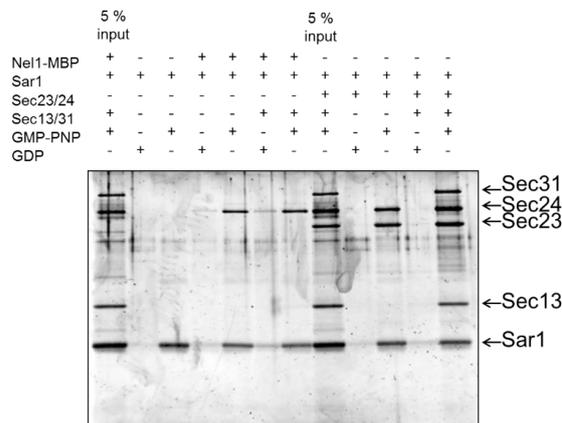


Fig. 4 Nel1 は膜上に Sec13/31 をリクルートしない

最後に、Nel1の細胞内での局在解析を行った。蛍光タンパク質を融合させたNel1を作成し、当初はown promoter下での観察を試みたが、Nel1の低い発現量のために蛍光を検出

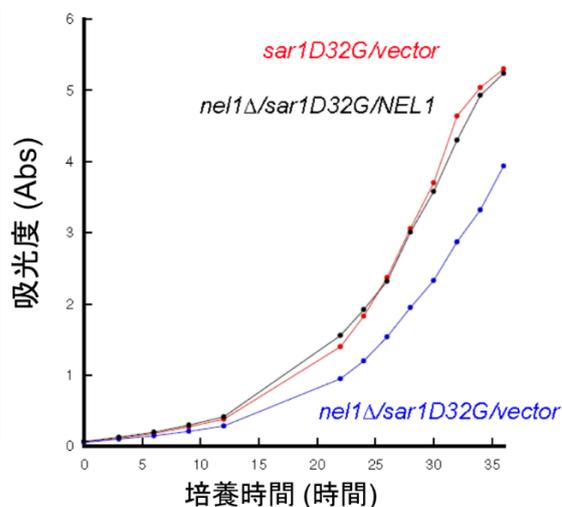


Fig. 5 Nel1 は Sar1 と遺伝学的相互作用を持つ

被覆タンパク質の内側のサブユニットであるSec23/24は、外側のサブユニットであるSec13/31と膜上で結合する。この時、Sec13/31はSec23のGAP活性を著しく促進する。ところがNel1のGAP活性にはSec13/31は一切影響を与えなかった。さらに、Nel1はSar1およびGTPの非水解アナログであるGMP-PNP存在下でSec23/24と同様に脂質膜に結合したが、Sec23/24とは異なり、Sec13/31との結合は見られなかった(Fig. 4)。このことから、Nel1はSar1のGAPではあるが、Sec23とは異なる働きをしていることが示唆された。

Nel1がSar1に対するGAP活性を持つことから、両者の細胞内での相互作用を探索した。その結果、*sar1*温度感受性変異株においてNel1を欠損させた場合、単独の変異体と比較して、非制限温度下においても、酵母細胞の生育遅延が起こることを発見した(Fig. 5)

することができなかった。そこで、Nel1-GFPおよびNel1-mCherryを過剰発現させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。すると、細胞質と核内での蛍光が確認された(Fig. 6)。Sec23/24を同様に観察すると、ER exit site (ERES)と呼ばれる小胞体上でのCOPII小胞形成部位がドット状に観察されることが知られているが、Nel1はそれとは異なる部位に局在していることが示された。また、Nel1をown promoterで発現させた場合の局在を解析

するために、Nel1-13Mycを作成し、細胞分画法で解析した。すると、Sec23は細胞質画分、膜画分双方に大きな差はなく局在するが、Nel1は9:1の割合で細胞質画分に多く局在した。これは、蛍光顕微鏡による観察結果と矛盾せず、Nel1はERESに局在するSec23とは異なり、細胞質に主に局在すると示唆された。これまで報告されているSec23ホモログはすべてERESに局在するため、この特徴的な局在から、Non-ERES Localized Sec23 homolog 1, Nel1と命名した。

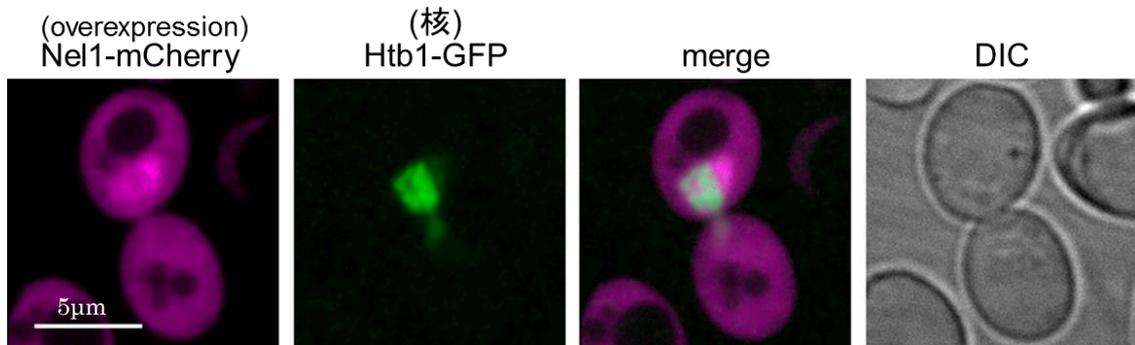


Fig. 6 Nel1 は細胞質と核に局在する

結果をまとめると、Nel1はSar1に対する強いGAP活性を示すものの、他のCOPII因子とは相互作用せず、ERESにも局在しなかった。このことから、Nel1は、COPII被覆タンパク質のコンポーネントとして機能しているわけではないと考えられる。しかし、Sar1とは遺伝学的相互作用を持ち、細胞内でSar1と機能的に関わりがあることも示唆された。これらのことから、Nel1は、これまで知られているSec23ホモログとは異なり、COPII小胞形成とは異なるところでSar1を制御する、Sar1の新規GAPであると考えられる(Fig.7)。本研究により、Sar1の新規機能の可能性が示唆された。今後は、Nel1とSar1の関与する機能が、生理学的にどのような意義を持つのか解析していきたい。

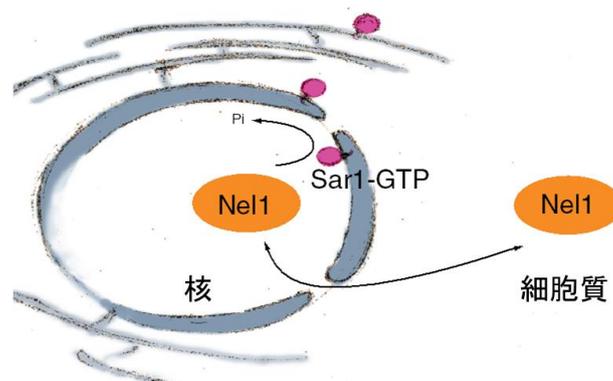


Fig. 7 Nel1 の機能のモデル図