



准教授  
農学博士  
新谷尚弘

平成 3 年 東北大学農学部卒業  
平成 9 年 東北大学大学院農学研究科  
博士課程修了  
平成 10~13 年 自然科学研究機構  
基礎生物学研究所（日本学術振興会  
特別研究員(PD)）  
平成 13~16 年 米国ミシガン大学  
ポスドク

## 出芽酵母における cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) 経路の輸送基質の同定

### はじめに

真菌や植物細胞の液胞は動物細胞のリソソームに相当するオルガネラであり、プロテアーゼやリボヌクレアーゼ、ポリリン酸分解酵素などの様々な加水分解酵素を含んでいる。このオルガネラは環境条件やストレスに応答して、タンパク質や脂質、核酸などの様々な高分子化合物を分解することにより細胞の構成成分を最適化しており、細胞の恒常性維持に重要な役割を果たしている。また、リソソームとは異なり液胞は二価イオンやアミノ酸などの低分子化合物やポリリン酸の貯蔵コンパートメントとしての機能も合わせ持つ。外界の栄養源が不足した場合には、これらの貯蔵物質が利用されるとともに、オートファジーと呼ばれる機構により自らの細胞質成分を非選択的に液胞に送り込んで分解することにより、飢餓条件下で生存するための最低限の栄養源を確保している。オートファジーの過程は①飢餓シグナルの伝達、②二重膜構造体による細胞質成分の囲い込み、③二重膜小胞と液胞膜との融合、④内膜小胞の液胞ルーメンへの放出と分解の4つに大別され、生体膜のダイナミックな動態を伴う。一方で、これら高分子基質を分解するための加水分解酵素群は主に初期分泌経路（小胞体、ゴルジ体）を経て液胞に輸送されるが、興味深いことにある種の液胞酵素は分泌経路を経ることなく直接細胞質から液胞へと輸送されることが出芽酵母において報告されている。この経路は **cytoplasm to vacuole targeting (Cvt)** 経路と呼ばれ、オートファジーとトポロジー的に類似した小胞輸送を伴う。また、遺伝学的にもオートファジーと Cvt 経路に必要な遺伝子の大半が重複していることが明らかとされており、Cvt 経路はオートファジーの一形態だと考えられる。両経路の主たる相違点は誘導条件と積み荷の選択性の有無である。一般的にオートファジーが飢餓条件下で誘導される非選択的な分解機構であるのに対し、Cvt 経路は選択的な液胞タンパク質の生合成経路であ

る。現在までに Cvt 経路で輸送されるタンパク質としてアミノペプチダーゼ I および  $\alpha$ -マンノシダーゼが報告されている。いずれも Atg19 と呼ばれるレセプタータンパク質によって認識されることにより、選択的に液胞へ輸送される。Atg19 によって認識される加水分解酵素が他に存在しているかどうかは明らかでない。そこで、当該研究では Cvt 経路で輸送される新規の液胞タンパク質を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

## 結果

### 1) Atg19 結合タンパク質の単離

Atg19 は 415 アミノ酸からなる親水性タンパク質であり、そのカルボキシ末端にはオートファゴソーム/Cvt 小胞のコンポーネントである Atg8 および Cvt カーゴレセプター複合体をオートファゴソームにリクルートする Atg11 との結合部位が存在する。中央部には coiled-coil ドメインがあり、アミノペプチダーゼ I と結合する。coiled-coil ドメインとカルボキシ末端の間に  $\alpha$ -マンノシダーゼ結合部位が存在する。Atg19-カーゴ複合体をアフィニティー精製するために、まず、Atg19 のカルボキシ末端にタンデム・アフィニティー精製 (TAP) タグを付加した融合タンパク質を発現させることとした。TAP タグはプロテイン A とカルモジュリン結合タンパク質を結合モジュールとして持ち、それらの間に特異性の高い TEV プロテアーゼの切断部位を有する。一段目の IgG セファロースに複合体を特異的に吸着させた後、TEV プロテアーゼ処理により複合体を溶出させ、二段目のカルモジュリン・セファロースに吸着させることにより高純度の複合体を精製することができる。Atg19 は Cvt 経路で液胞に輸送された後、液胞プロテアーゼ Pep4 依存的に分解されるため、Cvt 経路が不全となる *atg1 pep4* 二重破壊株を発現宿主とした。*atg1 pep4* 二重破壊株の染色体上 *ATG19* 翻訳領域の 3' 端にインフレーションとなるように TAP タグを挿入することにより、Atg19-TAP を発現させた。予備実験として、小スケール (100 OD 程度の細胞) での精製を行った。ガラスビーズを使用した機械的な破壊法によって細胞を破壊し、タンパク質を抽出した。この抽出液を IgG セファロースに供し、Atg19-TAP 複合体の結合性を解析した。しかし、Atg19-TAP 複合体の IgG セファロースに対する結合性は低く、回収率が低くなることが予想された。Atg19 のカルボキシ末端に結合することが知られている Atg8 および Atg11 などが TAP タグと IgG との結合を阻害することが考えられた。

そこで、次に Atg19 のアミノ末端にプロテイン A (protA) を付加した融合タンパク質の発現プラスミドを構築した。protA-Atg19 は培地中の銅イオン濃度によって発現がコントロールできる *CUP1* プロモーターを使用して発現させた。発現プラスミドを *atg1 pep4* 二重破壊株に導入し、小スケールでの精製を試みた。対照実験系として、プロテイン A を融合していない Atg19 を発現するプラスミドを導入した株を用いた。ガラスビーズ法によりタンパク質を抽出し、IgG セファロースに供したところ、良好な結合性が得られたため、実験スケールを大きくして複合体の精製を試みた。100 mM の銅イオンを含む培地で細胞

を培養し、約 2,000 OD の細胞を得た。予備実験と同様にガラスビーズ法によるタンパク質抽出を行ったが、細胞の破壊効率が低く十分量のタンパク質抽出物を得ることが出来なかった。そこで、効率よく細胞を破壊するために、酵素処理による酵母細胞壁の消化を行った後、界面活性剤処理することにより細胞膜を溶解し、タンパク質を抽出した。しかし、今度は細胞壁溶解に使用した市販酵素剤（ザイモリアーゼ）に含まれるプロテアーゼによるものと思われるタンパク質分解が起こり、複合体の回収率が著しく低下した。そこで、酵母細胞壁溶解酵素である *Arthrobacter luteus* lyticase ( $\beta$ -1,3-glucanase) を大腸菌で発現させ、同酵素が局在するペリプラズム画分を調製し、タンパク質抽出に用いた。タンパク質分解は改善されたものの、十分ではなかった。そこで、酵素処理による細胞壁溶解を行わず、液体窒素を用いた凍結破砕法で細胞を破壊することを試みた。乳鉢に注いだ液体窒素中に細胞懸濁液を滴下し、細胞を瞬間凍結させ、液体窒素が蒸発した後、乳棒で激しく潰した。液体窒素を何度か注ぎ低温を保ちながらこの操作を繰り返した。細かい粉状になったサンプルを溶解した後、緩衝液を加え、タンパク質抽出液とした。抽出液を分析したところ、抽出効率は良好であった。この抽出液を IgG セファロースに供し、低 pH の緩衝液で複合体を溶出させた。溶出液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で解析したところ、タンパク質分解が抑制されており、70 kDa の protA-Atg19 のバンドの他に、既に結合することが知られているアミノペプチダーゼ I (61 kDa) と  $\alpha$ -マンノシダーゼ I (125 kDa) と思われる特異的なバンドが検出された。さらに、30 kDa、17 kDa のシグナルが検出された。

## 2) アスパラギン酸アミノペプチダーゼ Yhr113w と Atg19 の結合

Ito らにより行われた酵母 2-hybrid 法による酵母プロテオームの網羅的結合解析により、Atg19 とアスパラギン酸アミノペプチダーゼ Yhr113w が結合することが示唆された (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2001)。Yhr113w は細胞質に局在する酵素タンパク質であると同定されている。そのため、一部の Yhr113w タンパク質が Atg19 と結合し、Cvt 経路で液胞に輸送される可能性がある。これを確認するために、まずアフィニティー単離法により、Yhr113w と Atg19 が結合するか解析した。protA-Atg19 と HA-タグを付加した Yhr113w を *atg1 pep4* 二重破壊株で発現させ、IgG セファロースを用いて細胞抽出液から protA-Atg19 を単離した。このサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロットング解析を行ったところ、Atg19 と Yhr113w の結合が検出された。さらに、HA-Yhr113w を発現させた *pep4* 破壊株と *atg19 pep4* 二重破壊株から液胞を単離し、抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロットング解析を行ったところ、Atg19 依存的に HA-Yhr113w が液胞画分に濃縮されていることが明らかとなった。このことから、少なくとも Yhr113w は Atg19 と複合体を形成し、液胞へ輸送されることが示された。

## 考察および展望

Atg19 にアフィニティー・タグを付加し、Atg19 結合タンパク質の精製を試みた。種々の Atg19 コンストラクトを作製し、IgG セファロースとの結合性の最適化を図った。その結果、アミノ末端にタグを付加したコンストラクトの IgG 結合効率が高いことが明らかとなった。精製スケールを大きくすると混入してくる不純物が問題となってくる。今後、アミノ末端に TAP タグを導入したコンストラクトを作製し、二段階のアフィニティー精製を行い高純度の複合体を得る必要がある。

タンパク質抽出法についても検討した。酵素処理による細胞壁除去を行うと、抽出効率は高いと思われるが、アルカリ pH 処理、還元剤処理、30℃でのインキュベーションなどを行わねばならず、タンパク質分解を招きやすく、タンパク質精製には向いていないと思われた。液体窒素を用いた凍結破砕法によって、高品質のタンパク質抽出液を再現性よく調製できることが明らかとなった。スケールアップにも対応できると考えられるため、今後この方法を用いてタンパク質抽出液を調製することとした。また、液胞の主要なプロテアーゼ 3 種類を欠いている酵母株を入手したので、この株を用いることにより、より安定したタンパク質抽出を行えると考える。

現在まで、2 種類の新規 Atg19 結合タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認している。今後、実験系をスケールアップしタンパク質を単離・同定する予定である。また、現在は富栄養条件下で生育させた酵母細胞から Atg19 結合タンパク質の単離を試みているが、液胞は様々な環境条件に応じてその構成成分を最適化しており、それぞれの条件で輸送されるタンパク質の構成が変化すると予想される。精製法を確立した後、様々な培養条件下で生育させた細胞から、複合体の単離を試みる。

アフィニティー/ウェスタンブロット法にて、Yhr113w タンパク質が Atg19 と結合し、液胞へ輸送されることを示した。しかし、このタンパク質が液胞で機能するために輸送されているのか、分解されるために輸送されているのか未だ明らかでない。今後、Yhr113w に対する抗体を作製し、輸送または分解基質なのか解析する。