

2024年度

青山学院大学審査学位論文の要約

指導教員 阿部文快 教授

出芽酵母の高圧環境適応に必要な
新規小胞体タンパク質 Ehg1 と
未知遺伝子群に関する分子基盤研究

The Molecular Basis Study on the Essential Novel
Endoplasmic Reticulum Protein Ehg1 and Unknown
Gene Groups for High-Pressure Environment
Adaptation in Budding Yeast

青山学院大学大学院

理工学研究科

理工学専攻

加藤 祐介

深海は高水圧、低温、低栄養源、さらには暗黒という過酷な条件が重なる環境であるが、その中には浅海では見ることのできない不思議な生物も棲息している。しかし、深海に生息する生物が高い水圧環境においてどのように生存しているのかについては未だ解明されていない部分が多く、今後の研究に対する期待が高まっている。当研究室では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の非必須遺伝子破壊ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、これまでに高圧 (25 MPa、25 °C) または低温 (0.1 MPa、15 °C) 下での増殖に必須な酵母遺伝子を 84 個同定している。この大規模スクリーニングで同定された遺伝子の中に、機能未知であるものが見出された。特に、*EHG1*、*MTC2*、*MTC4*、*MTC6*、*CSF1* と *DLT1* についてはほとんど報告例がないが、当研究室ではこれらの遺伝子が高圧下における栄養源輸送体の機能維持に重要であることを見出している。そこで、本研究ではこれら 6 つの遺伝子に関し、さらなる解析を行った。

機能未知タンパク質のうち、Ehg1 についてはこれまでにいくつかの知見が蓄積している。Ehg1 は ER-associated high-pressure growth gene 1 に由来する名称の小胞体膜局在タンパク質である。Ehg1 は通常の培養条件下では必須ではないが、高圧や低温条件下での増殖には不可欠である。そこでまず私は、このタンパク質の機能解明に際し、高親和性トリプトファン輸送体である Tat2 に着目した。Tat2 は高圧や低温などの外的ストレスに脆弱なことがわかっている。野生型の BY4742 株と *ehg1Δ* 株を 25 MPa で 5 時間培養したところ、野生株と比べて、*ehg1Δ* 株では高圧培養後の Tat2 レベルが著しく低下していた。このことは、Ehg1 が高圧下で Tat2 レベルを維持し、十分なトリプトファン取り込みを可能にするために重要であることを示唆している。次に、Ehg1 が Tat2 を安定化する機構について調べるために、脂質ラフトに注目した。脂質ラフトとは、細胞膜上でスフィンゴ脂質やエルゴステロールに富む流動性の低いドメイン構造として知られてき

た。しかし最近の研究から、脂質ラフトは数 10~100 nm 程度で動的な存在であろうという考え方が主流になってきた。私は、*ehg1Δ*株では Tat2 が脂質ラフトに正常に分配されず、機能低下または構造の不安定化が引き起こされているのではなかろうかと考えた。そこで、Detergent-insoluble membrane (DIM) isolation 法を用いて、Tat2 と脂質ラフトとの関係を調べた。この方法では、Triton X-100 により細胞膜を氷中で温和に処理すると、不溶性の膜画分がその後の超遠心分離によって浮かんでくる。本研究では、この不溶性膜画分を便宜的に「脂質ラフト」と呼ぶことにする。解析の結果、野生株では脂質ラフト画分に Tat2 が認められたものの、*ehg1Δ*株ではその大部分がノンラフト (Triton X-100 可溶性画分) に分配されていることがわかった。よって、Ehg1 には Tat2 の脂質ラフトへの分配を促進する働きがあり、*ehg1Δ*株における Tat2 の取り込み能の低下や高圧下での分解の促進は、脂質ラフトへの分配失陥である可能性が示唆された。

ER には、核の周りの perinuclear ER (pnER) と細胞膜直下の cortical ER (cER) が存在する。Tat2 は細胞膜タンパク質であることから、私は細胞膜により近い cER において Ehg1 が Tat2 と直接相互作用し、その安定性に寄与しているのではなかろうかと考えた。そこで、cER にのみ局在するキメラ型 Ehg1 (Ehg1-2xTcb3) 発現株を作製し解析を行ったところ、この株は高圧下で増殖することがわかった。よって、Ehg1 は cER 上で Tat2 を安定化する機能を有している可能性が示唆された。そこで、Ehg1 と Tat2 の相互作用を split ubiquitin 法によって解析したところ、2 つのタンパク質の相互作用が確認された。また、Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法によっても、それらの相互作用が示唆された。

次に私は、Ehg1 が細胞膜上の陥入構造である eisosome に着目した。Eisosome はスフィンゴ脂質やエルゴステロールに富み、Tat2 の安定的な局在に重要なのではないかと考えた。そこで、Tat2-mNG と Pil1-mCherry を同時に発現させた野

生株と *ehg1Δ* 株を作製し、両者が共局在する割合を比較した。その結果、野生株と比べて *ehg1Δ* 株では Tat2 と Pil1 の共局在率が低下していた。よって、*ehg1Δ* 株では Tat2 が eisosome に留まることができず、eisosome 外で不安定化している可能性が示唆された。以上の結果から、cER 上の Ehg1 は Tat2 と直接相互作用し、eisosome へとリクルートする働きがあるものと考えられる。このように、Ehg1 の Tat2 に対する作用機構が明らかになるとともに、cER タンパク質が栄養源輸送体の安定化を行うという新たな生命現象の発見に至った。

Ehg1 以外に Mtc2、Mtc4、Mtc6、Csfl および Dlt1 についても同様の実験を行ったところ、高圧下における Tat2 の安定性について同等の結果が得られた。また、これらの遺伝子破壊株では Tat2 の脂質ラフトへの分配にも失陥が見られた。そこで、こうした機能未知タンパク質に関する新たな知見を得るために、FLAG 融合した各タンパク質を細胞内に発現させ、質量分析 (LC-MS/MS) を用いて免疫沈降産物に含まれる結合タンパク質を同定した。その結果、興味深いことに Mtc2 と Csfl が相互作用し、さらに Dlt1 は Csfl と Mtc2 と相互作用していることが確認された。これらの結果から、Mtc2、Csfl と Dlt1 は複合体を形成して Tat2 の安定化や高圧増殖における協調的な役割を果たしている可能性が示唆された。

本研究により、Ehg1 をはじめとする機能未知タンパク質が、Tat2 や他の栄養源輸送体においても細胞膜上での安定性を高め、高圧下における栄養源の取り込みを可能にしていることが明らかとなった。「栄養源の取り込み」という従属栄養生物にとって不可欠なプロセスが、高圧ストレス下ではこれまで機能未知だったタンパク質群によって支えられている事実は非常に興味深い。今後は、酵母のみならず、深海生物の高圧適応機構の解明に寄与する可能性が期待される。