

# 多様で特異的な翻訳後修飾を制御するゴルジュユニットの形成メカニズム

慶應義塾大学 医学部 生理学教室 岡野研究室

後藤 聡

## 1. はじめに

膜・分泌蛋白質の90%以上は、糖鎖などによる翻訳後修飾を受けることによって、正しい機能を発揮する。そのように重要な糖鎖修飾の特徴として、糖鎖には非常に多くの種類が存在するが(多様性)、ランダムに蛋白質に付加されるのではなく、蛋白質や細胞の種類によって、特定の蛋白質には特定の糖鎖が付加される(特異性)ことが挙げられる。だが、このような糖鎖修飾の多様性と特異性がどのようにして制御されているかについては、ほとんどわかっていないのが現状である。私達は、糖鎖修飾の多様性と特異性を制御する新たなメカニズムとして、「ゴルジ体は今まで考えられていたように一種類ではなく、異なる糖鎖修飾をおこなう機能的に異なるゴルジ体(ゴルジュユニット)が存在すること」を見出した。本研究では、このゴルジュユニットがどのように形成されるのかを明らかにし、私達が独自に提唱したゴルジュユニットの分子的基盤を解明することを目指した。

まず、ゴルジュユニットについて簡単に紹介する。ショウジョウバエや哺乳動物のある種の神経細胞においては、ゴルジ体は細胞内に数十個あり散在している。私達は、ショウジョウバエを用いて、これらのミニゴルジ体には、それぞれ異なるセットの糖鎖修飾酵素などが局在しており、それぞれ異なるミニゴルジ体には、それぞれに適した蛋白質が輸送されることによって、それぞれの蛋白質に適した糖鎖が付加されることを見出した。このように異なる機能を持つゴルジ体のことを「ゴルジュユニット」と名づけた。

では、そのようなゴルジュユニットはどのようにして形成されるのか?異なるゴルジュユニットが形成されるためには、異なるゴルジュユニットに局在またはそこで修飾される蛋白質が、小胞体で翻訳されたのち、それぞれ異なるゴルジュユニットに選別輸送される必要がある。実際に、酵母では、GPI結合型蛋白質は小胞体からゴルジ体に輸送されるときに、他の膜蛋白質とは異なる輸送小胞に格納され運ばれることが報告されている。そこで、本研究では、ショウジョウバエのGPI結合型蛋白質であるDally-like protein (Dlp)をモデル蛋白質に用いて、その翻訳、GPI付加、そして輸送小胞への格納のプロセスを明らかにすることで、ゴルジュユニットの形成基盤の解明を目指した。

## 2. 方法

用いたショウジョウバエ系統

コントロール系統として、Canton-S または y,w 系統を用いた。PGAP5の変異体は、Bloomington Drosophila Stock Centerから購入した。

*in situ* hybridization

ショウジョウバエの三齢幼虫をPBS中で解剖し、翅原基を取り出した。翅原基は、4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液中で、4度、一晚固定した。PBS + 0.1%Tweeb20で洗浄後、メタノールの希釈列で脱水し、100%メタノール中で、-20度一晚固定した。メタノールの希釈列で水系に戻した後、プロテアーゼ処理を行った。洗浄後、4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液中で、室温、20分間再固定した。洗浄後、55度、hybridization solution中でpre-hybridizationを行い、その後、Digoxigenin 標識の Riboprobe を添加し、55度で一晚インキュベートした。PBS + 0.1%Tweeb20 で洗浄、ブロッキング液でブロッキングしたのち、抗Digoxigenin抗体と4度一晚インキュベートした。洗浄後、ストレプトアビジン標識のHorse Radish Peroxidaseと、室温、2時間インキュベートした。洗浄後、チラミド染色キットを用いて発色させた。洗浄後、褪色防止剤入りのグリセロールでスライドグラスにマウントし、共焦点顕微鏡で観察した。

## 免疫染色

シヨウジョウバエの三齢幼虫をPBS中で解剖し、翅原基を取り出した。翅原基は、4%パラフォームアルデヒド/PBS中で、室温、20分間固定した。PBS + 0.1%TritonX100 で洗浄後、PBS + 0.1%TritonX100 + 0.5%BSAで、室温、30分間ブロッキングした。PBS + 0.1%TritonX100 + 0.5%BSAで適宜希釈した一次抗体と、一晚、4度でインキュベートしたのち、洗浄後、PBS + 0.1%TritonX100 + 0.5%BSAで適宜希釈した二次抗体と、4度一晚、または室温2時間以上でインキュベートした。洗浄後、褪色防止剤入りのグリセロールでスライドグラスにマウントし、共焦点顕微鏡で観察した。

使用した抗体は、私達が作成した抗PigB抗体、Developmental Studies Hybridoma Bankから購入した抗Lamin抗体、市販されている蛍光標識した抗ウサギIg、抗ラットIg、抗マウスIg抗体である。

## 抗体作成

PigBの部分アミノ酸配列をペプチド合成し、それをラットまたはウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を生成した。

## 3. 結果 研究成果

d1p mRNAが翻訳されるのは、小胞体全体か、特定の領域かを調べるために、d1p mRNAの局在を、高感度のin situ hybridization methodを用いて調べた。シヨウジョウバエの上皮性組織である翅原基で局在を調べたところ、核膜近傍の小胞体に局在することがわかった。このことは、d1p mRNAは、核膜近傍の小胞体で翻訳されていることを強く示唆している。

翻訳されたD1pは、inositolから生合成されたGPIと共有結合することでGPI結合蛋白質として完成するので、GPIの生合成も核膜近傍の小胞体で行われている可能性が考えられた。そこで、実際にGPIは核膜近傍の小胞体で生合成されているのか、それとも別の領域で生合成されているかについて検討を行った。そのために、GPIの生合成酵素のひとつであるPigB酵素に対する抗体を作成し、翅原基を用いて、PigBの局在を調べた。その結果、驚くべきことに、PigBは核膜に局在していた。このことは、GPIは核膜で生合成されていることを示している。

GPI付加されたD1p蛋白質が小胞体からゴルジ体に輸送される際に、特定の領域で輸送小胞に格納されるかどうかについて検討した。GPI付加された蛋白質は、PGAP5という酵素によってGPI部分がリモデリングされなければ、輸送小胞に格納されない。そこで、シヨウジョウバエのPGAP5の変異体を用いて、D1pがどの小胞体に蓄積するかを調べたところ、D1pはアピカル側の小胞体に蓄積しているらしいという予備的結果を得た。このことは、GPI付加されたD1p蛋白質は、アピカル側の小胞体に運ばれ、そこで輸送小胞に格納されている可能性を示唆している。

## 4. 考察 まとめ

本研究の結果は、今まで考えられていたGPIの生合成、付加過程に修正を迫るものである。すなわち、今までは、GPIは小胞体全般で生合成されると考えられていたが、本研究によって、核膜で生合成されることがわかった。さらに、GPI結合型蛋白質D1pも核膜近傍の小胞体で翻訳されることがわかった。以上の結果より、核膜で生合成されたGPIは、その近傍の小胞体に運ばれ、そこで、翻訳されたばかりのGPI結合蛋白質に付加されると考えられた。

そのようにしてGPI付加されたD1p蛋白質は、アピカル側の小胞体に移動し、そこで輸送小胞に格納されると考えられた。さらに、アピカル側の小胞体で輸送小胞に格納されたD1pは、アピカル側にあるゴルジユニットに輸送される可能性が高い。このアピカル側への選択輸送という可能性は、先行研究が示した「D1p蛋白質はいったんアピカル側の細胞膜に輸送される」という結果に合致する。

以上の結果は、アピカル側のゴルジユニットの形成には、小胞体上での選別輸送が重要な役割を果たしていることを示唆している。

また、観点を変わると、いままでも小胞体には粗面・滑面の違いはあるものの、それ以上の領域化はよくわかっていなかった。本研究は、小胞体にも異なる領域が存在することを示しており、その領域化がゴルジユニットの形成に主要な役割を果たす可能性を見出した。

5. 発表論文、参考文献

Structure, Function and Formation of Glycans in *Drosophila*.

Yamamoto-Hino,M., Okano,H., Kanie,O. and **Goto,S.**

In “Glycans: Biochemistry, Characterization and Applications.”

Mora Montes, H. M. ed. Nova Science publishers, Inc., NY (in press)

Identification of genes required for neural-specific glycosylation using functional genomics.

Yamamoto-Hino,M., Kanie,Y., Awano,W., Aoki-Kinoshita,K.F., Yano,H., Nishihara,S., Okano,H., Ueda,R., Kanie,O. and **Goto,S.**

**PLoS Genetics**, 6, e1001254 (2010)

Distinct functional units of the Golgi complex in *Drosophila* cells.

Yano,H., Yamamoto-Hino,M., Abe, M.,Kuwahara,R., Haraguchi,S., Kusaka,I., Awano,W., Kinoshita-Toyoda,A., Toyoda,H. and **Goto, S.**

**Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102, 13467-13472 (2005)