

酵母の細胞内タンパク質輸送と小胞体関連分解

細見 昭

信州大学大学院総合理工学研究科農学専攻先端生命科学分野

要約 酵母は真核生物に属する生物である。古来、発酵に用いられており人類にとって身近で有用な微生物の1つである。一方、生物学（分子生物学、細胞生物学）にとっても有用な微生物である。酵母は培養が容易であり、真核生物であるため基本的な細胞構造が人と共通という2つの利点がある。それゆえ、モデル真核生物として科学研究に用いられてきている。原核生物に比べて、真核生物は複雑な細胞内膜構造を有している。真核生物の細胞内は核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソーム等の細胞小器官とその周りを満たす細胞質で構成されている。各細胞小器官が正しく機能するためにはタンパク質が正しく作られ、正しく輸送されなければならない。ゆえに、タンパク質の生合成と輸送と分解に関する研究がこれまで盛んに行われてきた。本総説では、特に酵母の細胞内タンパク質輸送と小胞体関連分解に関して議論したい。

キーワード：酵母，細胞内タンパク質輸送，SEC 遺伝子，VPS 遺伝子，小胞体関連分解（ERAD）

1. 序 論

酵母は正式な生物学的分類ではない。真菌類に属する一部の菌が酵母と呼ばれている。*Saccharomyces cerevisiae* は出芽酵母の1種であり、いわゆるパン酵母や清酒酵母及びワイン酵母は*S. cerevisiae* に属している。しかしながら、研究に用いられている酵母は*S. cerevisiae* だけではない。その他に、分裂酵母の1種である *Schizosaccharomyces pombe* の他、*Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans* 等が用いられている。特に *S. cerevisiae*（出芽酵母）と *S. pombe*（分裂酵母）は、真核生物に属している点、単細胞生物である点、容易に培養できる点、遺伝子改変が容易である点等の利点を持っているので、モデル真核生物として分子生物学、細胞生物学に利用されてきた。細胞周期に関する研究（出芽酵母及び分裂酵母）によりリーランド・ハートウェル博士とポール・ナース博士、細胞内タンパク質輸送に関する研究（出芽酵母）によりランディ・シェクマン博士、オートファジーに関する研究（出芽酵母）により大隅良典博士がそれぞれノーベル生理学・医学賞を受賞している。このように、酵母は生命現象を明らかにするツールとして活用されてきた。本総説では、特に細胞内タンパク質輸送と

小胞体関連分解に関して最新の情報を交えつつ論じたい。

2. タンパク質分泌を担う小胞輸送

真核生物のタンパク質の分泌とは細胞内タンパク質輸送機構によりタンパク質が細胞外に輸送されることである。新生された分泌タンパク質はリソソームで合成されると小胞体に輸送される。続いて、タンパク質は小胞体からゴルジ体に輸送される。ゴルジ体の中をシスからトランスに移動したタンパク質はトランスゴルジネットワーク（TGN）に至る。最終的に、タンパク質はTGNから細胞外に輸送される。細胞小器官同士及び細胞小器官と細胞膜間のタンパク質輸送は小胞輸送によってなされている。小胞輸送は、送り手の細胞小器官から輸送されるべきタンパク質が選別及び濃縮された小胞が出芽し、その小胞が受け手の細胞小器官に融合することで達成される（図1）。分泌タンパク質の殆どは、この小胞輸送によって運ばれる。小胞輸送は小胞体からゴルジ体に至る経路に代表されるような順方向だけでなく、ゴルジ体から小胞体へタンパク質を輸送するような逆方向の輸送にも用いられる。この逆行輸送によって、誤局在したタンパク質が本来働く細胞小器官に送り返される。このようにして、各細胞小器官に存在するタンパク質は維持されている。小胞の形成時には、輸送するタンパク質を選別する受容

受理日 2016年10月31日

採択日 2017年1月25日

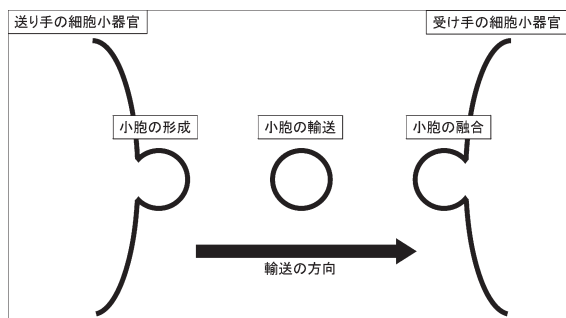


図1：小胞輸送

送り手の細胞小器官から輸送小胞が形成され、その中に輸送されるべきタンパク質が取り込まれる。小胞は、輸送された後、受け手の細胞小器官と融合しタンパク質が受け渡される。

体タンパク質や小胞形成を担う被覆タンパク質等が働く。一方、小胞の融合時には、小胞と細胞小器官の両方に存在する小胞融合を担うタンパク質が働く。このように小胞輸送には多くのタンパク質が機能している。小胞輸送の研究は、真核細胞の基本的な生命現象を解明することだけでなく酵母を用いたタンパク質生産にも貢献できる。ゆえに、基礎及び応用的な見地から研究が進められている¹⁾。

出芽酵母の実験系を利用して、分泌に関与する遺伝子を多数同定したのが、シェックマンである。シェックマンらによって同定された遺伝子は *SEC* (secretory) 遺伝子として知られている。シェックマンらは、分泌タンパク質であるインペルターゼと酸性ホスファターゼが高温 (37°C) 下で細胞外に分泌されない温度感受性変異株を取得した。電子顕微鏡で観察すると、この変異株に小胞の蓄積が起こっていることが確かめられ、得られた変異株は *sec1-1* と名付けられた²⁾。後に、この手法に改良が加えられ、密度勾配遠心法によって細胞内にタンパク質が蓄積し細胞が肥大した株を選別することで変異株を取得しやすくして多くの *sec* 変異株が取得された³⁾。これらに加えて、酵母の生育によってタンパク質が小胞体に輸送されたかを確認する新しい手法が用いられ *SEC61* 及び *SEC62* 遺伝子が同定された⁴⁾。Sec61 タンパク質は小胞体膜に存在する複数膜貫通タンパク質であり、細胞質から小胞体へタンパク質を輸送するチャネルタンパク質である。現在、Sec タンパク質は40個以上同定されている (表1)。

3. 液胞タンパク質輸送経路とエンドサイトーシス

酵母や植物が持っている液胞は哺乳類のリソソーム

ムに相当する細胞小器官である。液胞は内腔が酸性の細胞小器官であり、その pH は液胞膜に存在する H⁺ポンプによって保たれている。液胞内には、アミノ酸、イオン、ポリリン酸等が貯められており、それが細胞内 (細胞質) の浸透圧及びイオン恒常性の調節に寄与している。また、液胞には様々な加水分解酵素 (ヌクレアーゼ、プロテアーゼ、グリコシダーゼ、リパーゼ、ホスファターゼ、スルファターゼ、ホスホリパーゼ等) が存在し、不要物の分解に機能している。このように液胞は貯蔵及び分解のための細胞小器官といえる。多くの液胞加水分解酵素が分泌経路を一部利用して輸送されるが、細胞膜に向かって輸送される分泌タンパク質とは TGN から液胞加水分解酵素は TGN において特異的に選別されて液胞に輸送される (図2)。また、TGN から液胞に至る経路には2通りあり、1つはエンドソームを介する経路で、もう1つはエンドソームを介さず直接液胞に至る経路である (図3)。

出芽酵母において、液胞タンパク質輸送に必要な因子として *VPS* (vacuolar protein sorting) 遺伝

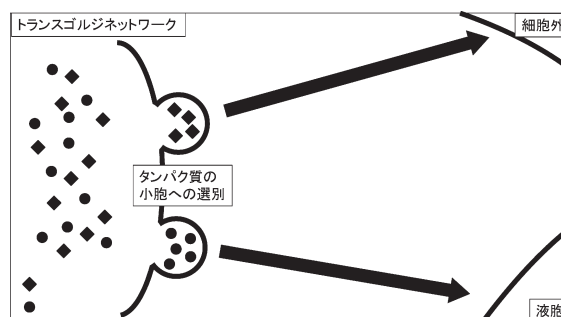


図2：タンパク質の選別

TGN において、各タンパク質は選別されてそれぞれの目的地に向かう小胞に取り込まれ輸送される。

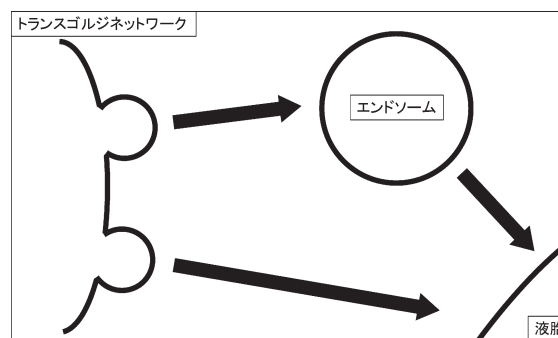


図3：液胞タンパク質輸送の2つの経路

液胞タンパク質は TGN から2つの経路で輸送される。一方はエンドソームを介する経路であり、もう一方は TGN から液胞へ直接輸送される経路である。

表1 出芽酵母 SEC 遺伝子

遺伝子名	体系的名称	主な細胞内局在	機能
SEC1	YDR164C	bud neck, bud tip, 細胞膜	Sec1p/Munc-18 ファミリー
SEC2	YNL272C	bud neck, bud tip, 細胞質	グアニンヌクレオチド交換因子 (for Sec4)
SEC3	YER008C	bud neck, bud tip, exocyst	エクソシスト複合体サブユニット
SEC4	YFL005W	輸送小胞, 初期 bud site	Rab ファミリー低分子量 G タンパク質
SEC5	YDR166C	bud neck, bud tip, exocyst	エクソシスト複合体サブユニット
SEC6	YIL068C	bud neck, bud tip, exocyst	エクソシスト複合体サブユニット
SEC7	YDR170C	細胞質, 後期エンドソーム	グアニンヌクレオチド交換因子 (for ADP リボシル化因子)
SEC8	YPR055W	bud neck, bud tip, exocyst	エクソシスト複合体サブユニット
SEC9	YGR009C	細胞膜 (SNARE 複合体)	SNAP receptor (SNARE)
SEC10	YLR166C	bud neck, exocyst	エクソシスト複合体サブユニット
SEC11	YIR022W	小胞体	シグナルペプチダーゼ複合体サブユニット
SEC12	YNR026C	小胞体, ゴルジ体	グアニンヌクレオチド交換因子 (for Sar1)
SEC13	YLR208W	COPII 小胞	COPII 被覆タンパク質
SEC14	YMR079W	細胞質, ゴルジ体	ホスファチジルイノシトール/ホスファチジルコリン交換タンパク質
SEC15	YGL233W	bud neck, bud tip, exocyst	エクソシスト複合体サブユニット
SEC16	YPL085W	小胞体	COPII 被覆タンパク質
SEC17	YBL050W	細胞質	Soluble NSF-attachment protein (SNAP)
SEC18	YBR080C	細胞質, ゴルジ体	N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)
GDI1(SEC19)	YER136W	未知	GDP 解離阻害タンパク質
SEC20	YDR498C	小胞体	SNARE
SEC21	YNL287W	COPI 小胞	COPI 被覆タンパク質
SEC22	YLR268W	小胞体, ゴルジ体	SNARE
SEC23	YPR181C	COPII 小胞	GTPase 活性化タンパク質
SEC24	YIL109C	COPII 小胞	COPII 被覆タンパク質
SEC26	YDR238C	COPI 小胞	COPI 被覆タンパク質
SEC27	YGL137W	COPI 小胞	COPI 被覆タンパク質
SEC28	YIL076W	COPI 小胞	COP 被覆タンパク質
SEC31	YDL195W	COPII 小胞	COPII 被覆タンパク質
BOS1(SEC32)	YLR078C	小胞体	SNARE
COP1(SEC33)	YDL145C	COPI 小胞	COPI 被覆タンパク質
COG3(SEC34)	YER157W	ゴルジ体	Conserved Oligomeric Golgi (COG) 複合体サブユニット
COG2(SEC35)	YGR120C	ゴルジ体	COG 複合体構成因子
COG1(SEC36)	YGL223C	ゴルジ体	COG 複合体構成因子
COG6(SEC37)	YNL041C	ゴルジ体	COG 複合体構成因子
COG4(SEC38)	YPR105C	ゴルジ体	COG 複合体構成因子
SEC39	YLR440C	小胞体	SNARE tethering 複合体構成因子
SEC53	YFL045C	細胞質	ホスホマンノムターゼ
SEC59	YMR013C	小胞体	ドリコールキナーゼ
SEC61	YLR378C	小胞体	タンパク質輸送チャネル
SEC62	YPL094C	小胞体	Sec62-Sec63 複合体サブユニット
SEC63	YOR254C	小胞体	Sec62-Sec63 複合体サブユニット
SEC65	YML105C	小胞体	Signal recognition particle (SRP) サブユニット
SEC66(SEC71)	YBR171W	小胞体	Sec62-Sec63 複合体サブユニット
SEC72(SEC67)	YLR292C	小胞体	Sec62-Sec63 複合体サブユニット

子が同定され報告されている^{5,6)}。VPS 遺伝子は VPL (vacuolar protein localization-defective mutants) 遺伝子及び VPT (vacuolar protein targeting) 遺伝子として別々に同定された遺伝子群が統合された遺伝子名である^{7,8)}。どちらの遺伝子群も液胞加水分解酵素カルボキシペプチダーゼ Y (carboxypeptidase Y (CPY)) の細胞外への誤輸送 (漏出) を指標に取得された (図 4)。CPY は TGN からエンドソームを経て液胞に輸送されるので、エンドソームを介した液胞タンパク質輸送に必要な遺伝子が数多く同定されている。また、液胞タンパク質輸送の異常は液胞の形態に影響を与える。ゆえに、vps 遺伝子変異株では液胞形態異常が起こる。その液胞形態を指標として VPS 遺伝子のクラス分けが行われ、各 Vps タンパク質の機能解析に利用されている⁹⁾。現在、Vps タンパク質は50個以上同定されている (表2)。既述のように、CPY の液胞への選別は TGN で行われる。TGN において、CPY の N 末端にある24-QRPL-27配列が液胞選別

シグナルとして受容体タンパク質である Vps10に認識されエンドソームに輸送される小胞に選択的に取り込まれる。CPY と Vps10 はエンドソームで解離する。その後、Vps10 は逆行輸送によって TGN に送り返され、また受容体として働く (図5)¹⁰⁻¹²⁾。

液胞タンパク質輸送に関する研究は出芽酵母だけでなく分裂酵母でも進められている。分裂酵母にも

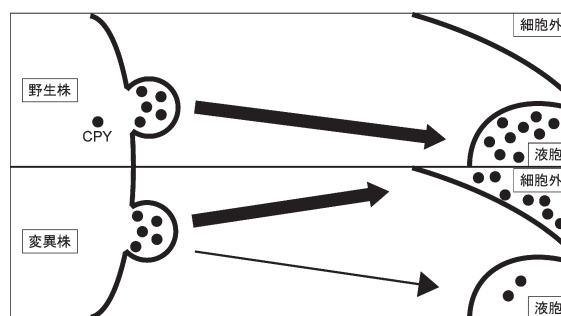


図4：CPY の誤輸送

CPY は通常液胞に輸送されるが、輸送経路に異常がある変異株では CPY が細胞外に漏出されることがある。

表2 出芽酵母 VPS 遺伝子

遺伝子名	体系的名称	主な細胞内局在	機能
VPS1	YKR001C	アクチンパッチ, 液胞, 後期エンドソーム	ダイナミン
DID4 (VPS2, VPS14)	YKL002W	細胞質	ESCRT-III 複合体サブユニット
VPS3	YDR495C	CORVET 複合体	CORVET 複合体構成因子
VPS4	YPR173C	エンドソーム	AAA-ATPase
VPS5	YOR069W	細胞質, エンドソーム, レトロマー複合体	Nexin-1ホモログ
PEP12 (VPS6)	YOR036W	エンドソーム, ゴルジ体	SNARE
VPS8	YAL002W	CORVET 複合体, エンドソーム	CORVET 複合体構成因子
VPS9	YML097C	細胞質	グアニンヌクレオチド交換因子
PEP1 (VPS10)	YBL017C	ゴルジ体	選別受容体 (for CPY)
PEP5 (VPS11)	YMR231W	CORVET 複合体, 液胞, HOPS 複合体	CORVET 複合体構成因子
VPS13	YLL040C	前胞子膜	前胞子膜形成
VPS15 (VPS40)	YBR097W	核膜孔, 核-液胞接合部位, PI3キナーゼ複合体	セリン/スレオニンキナーゼ
VPS16	YPL045W	CORVET 複合体, 液胞, HOPS 複合体	HOPS, CORVET 複合体サブユニット
VPS17	YOR132W	エンドソーム, レトロマー複合体	レトロマー複合体サブユニット
PEP3 (VPS18)	YLR148W	CORVET 複合体, 液胞, HOPS 複合体	CORVET 複合体構成因子
PEP7 (VPS19)	YDR323C	細胞質, エンドソーム	アダプタータンパク質
VPS20	YMR077C	細胞質, ESCRT-III 複合体	ESCRT-III 複合体サブユニット
VPS21 (VPS12)	YOR089C	後期エンドソーム	Rab ファミリー GTPase
SNF8 (VPS22)	YPL002C	ESCRT-II 複合体	ESCRT-II 複合体構成因子
STP22 (VPS23)	YCL008C	細胞膜 (細胞質側), ESCRT-I 複合体	ESCRT-I 複合体構成因子
VPS24	YKL041W	細胞質, ESCRT-III 複合体	ESCRT-III 複合体サブユニット
VPS25	YJR102C	ESCRT-II 複合体	ESCRT-II 複合体構成因子
PEP8 (VPS26)	YJL053W	エンドソーム, レトロマー複合体	レトロマー複合体サブユニット
VPS27	YNR006W	エンドソーム	Ub タンパク質選別
VPS28	YPL065W	エンドソーム, ESCRT-I 複合体	ESCRT-I 複合体構成因子
VPS29	YHR012W	エンドソーム, レトロマー複合体	レトロマー複合体サブユニット
VPS30	YPL120W	細胞質, PI3キナーゼ複合体	PI3キナーゼ複合体サブユニット
BRO1 (VPS31)	YPL084W	細胞質, エンドソーム	脱ユビキチン化
SNF7 (VPS32)	YLR025W	細胞質, ESCRT-III 複合体	ESCRT-III 複合体サブユニット
VPS33	YLR396C	CORVET 複合体, 細胞質, 液胞, HOPS 複合体	HOPS, CORVET 複合体サブユニット
VPS34 (VPS7)	YLR240W	エンドソーム, 液胞, PI3キナーゼ複合体	PI3-キナーゼ
VPS35	YJL154C	エンドソーム, 液胞, レトロマー複合体	レトロマー複合体サブユニット
VPS36	YLR417W	ESCRT-II 複合体	ESCRT-II 複合体構成因子
SRN2 (VPS37)	YLR119W	エンドソーム, ESCRT-I 複合体	ESCRT-I 複合体構成因子
VPS38	YLR360W	PI3キナーゼ複合体	PI3キナーゼ複合体構成因子
VAM6 (VPS39)	YDL077C	液胞, HOPS 複合体	グアニンヌクレオチド交換因子 (for Gtr1)
VPS41	YDR080W	液胞, HOPS 複合体	HOPS 複合体サブユニット
VAM7 (VPS43)	YGL212W	液胞, SNARE 複合体	SNARE
NHX1 (VPS44)	YDR456W	初期エンドソーム, 液胞, 後期エンドソーム	Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体
VPS45	YGL095C	細胞質, ゴルジ体, SNARE 複合体	Sec1p/Munc-18ファミリー
DID2 (VPS46)	YKR035W-A	細胞質, 後期エンドソーム	Class E Vps タンパク質
VPS51 (VPS67)	YKR020W	Golgi-associated retrograde protein (GARP) 複合体, ゴルジ体	GARP 複合体サブユニット
VPS52	YDR484W	GARP 複合体, ゴルジ体	GARP 複合体サブユニット
VPS53	YJL029C	GARP 複合体, ゴルジ体	GARP 複合体サブユニット
VPS54	YDR027C	GARP 複合体, ゴルジ体	GARP 複合体サブユニット
VPS55	YJR044C	後期エンドソーム, Vps55/Vps68 複合体	未知
VPS62	YGR141W	小胞体, 液胞	未知
VPS63	YLR261C	未知	未知
VPS64	YDR200C	小胞体, endoplasmic reticulum - Golgi intermediate compartment (ERGIC)	未知
LOA1 (VPS66)	YPR139C	小胞体	リゾホスファチジン酸アシル基転移酵素
VPS68	YOL129W	液胞, Vps55-Vps68複合体	未知
VPS70	YJR126C	小胞体	未知
VPS71	YML041C	Swr1複合体	Swr1複合体構成因子
VPS72	YDR485C	Swr1複合体	Swr1複合体構成因子
VPS73	YGL104C	液胞, ミトコンドリア	糖輸送体
VPS74	YDR372C	細胞質, ゴルジ体	PI4-キナーゼエフェクター

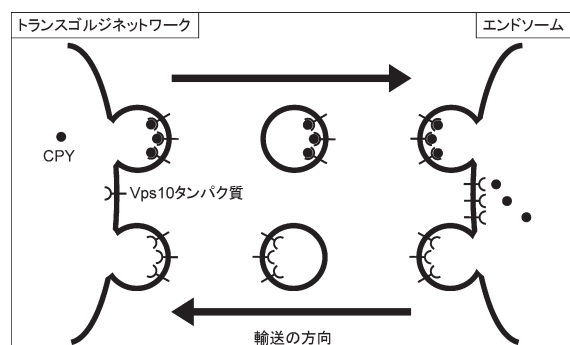


図5: CPY 受容体 Vps10の働き

CPYは受容体タンパク質であるVps10によってエンドソームに輸送される小胞に取り込まれる。

多くのVPSホモログ遺伝子が存在することが分かっている¹³⁾。また、分裂酵母のCPYは出芽酵母のCPYと異なり、成熟(液胞)型は二量体を形成しているが¹⁴⁾、Vps10タンパク質による選別は共通である¹⁵⁾。

4. SNARE タンパク質

小胞輸送において小胞と細胞小器官の膜融合を担っているタンパク質がSNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) attachment

protein (SNAP) receptor) である。SNARE は小胞膜と細胞小器官膜の両方に存在する。SNARE タンパク質は60~70アミノ酸からなる SNARE モチーフを有している。この SNARE タンパク質同士が結合することによって膜融合がなされることが考えられている^{16,17)}。膜融合を終えた後、結合した SNARE タンパク質複合体は ATP のエネルギーで解離され再利用される。SNARE タンパク質複合体の解離を担っているタンパク質が NSF (Sec18) と SNAP (Sec17) である。NSF 及び SNAP のみならず、SNARE 遺伝子も出芽酵母 *SEC* 遺伝子として同定されており (表 1), 膜融合過程がタンパク質の分泌に重要であることが裏付けられている。加えて、SNARE タンパク質が小胞輸送の膜融合のみならず細胞小器官同士の膜融合に重要であることが出芽酵母 SNARE タンパク質を用いた液胞膜融合に関する研究で明らかになっている。

出芽酵母だけでなく、分裂酵母においても SNARE タンパク質の研究が行われている。分裂酵母にも Vam7 を含む多くの SNARE ホモログ遺伝子が保存されているが¹⁸⁾, 出芽酵母で液胞膜に局在する SNARE タンパク質 Vam3 に相当する SNARE 遺伝子が存在しない¹³⁾。筆者は、出芽酵母では Vam3 とエンドソーム局在 SNARE タンパク質 Pep12 が相補的に機能しているのに対して、分裂酵母では Pep12 ホモログタンパク質が両方の機能を果たしていることを明らかにした¹⁹⁾。一般的に、出芽酵母は 1 細胞に 2~3 個の液胞を有しているが、分裂酵母は 1 細胞に数十個の液胞を有している。筆者は、この違いの一因に SNARE タンパク質の種類の違いが寄与していると推測している。

5. 小胞体関連分解

分泌経路で輸送されるタンパク質は生合成された後、小胞体に輸送される。小胞体内腔において、シャペロンタンパク質の働きで、新生タンパク質の立体構造が整えられる。正しい立体構造や複合体形成を獲得したタンパク質は小胞輸送によってそれぞれの目的地に輸送される。一方、正しい立体構造を獲得できなかったタンパク質はその異常が小胞体内のタンパク質によって認識され、再度立体構造が整えられる。最終的に正しい立体構造を獲得できなかったタンパク質は、小胞体から細胞質に逆輸送され、プロテアソームによって分解される。この分解機構は小胞体関連分解 (ER-associated degradation

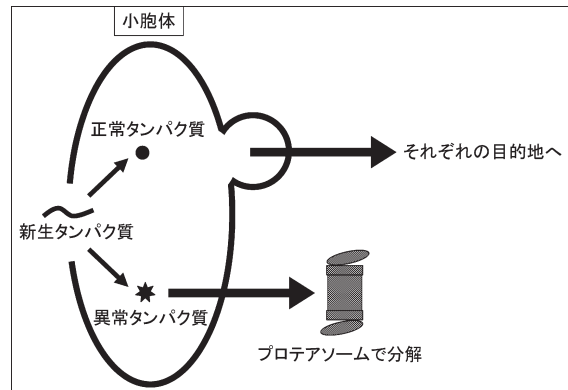


図 6：小胞体関連分解

新生タンパク質は小胞体において立体構造が整えられる。正しい立体構造を獲得した正常タンパク質はそれぞれの目的地に輸送される。一方、正しい立体構造を獲得できなかった異常タンパク質は細胞質に逆輸送された後、プロテアソームで分解される。

(ERAD)) と呼ばれている (図 6)。

分泌経路で輸送されるタンパク質の多くは糖鎖付加を受ける。代表的なタンパク質の糖鎖付加に *N* 結合型糖鎖がある。*N* 結合型糖鎖はタンパク質中のアスパラギン、プロリンを除く任意のアミノ酸、セリンもしくはスレオニン (N_xS/T ($x \neq P$)) 配列のアスパラギンの側鎖に付加される。*N* 型糖鎖付加は一般的に新生タンパク質が小胞体に輸送されると同時に小胞体膜に存在するオリゴ糖転移酵素 (OST) によって付加される。新生されたタンパク質が *N* 型糖タンパク質の場合、タンパク質のフォールディングをモニターするために *N* 型糖鎖が用いられており²⁰⁾, *N* 型糖鎖はタンパク質の立体構造を整える上で役に立っている。一方、プロテアソームでタンパク質が分解される際には *N* 型糖鎖は邪魔な存在になる。タンパク質は円筒形のプロテアソームの狭い内部で分解されるので、嵩高い *N* 型糖鎖は分解の妨げになると考えられている。実際に、酵母を含む真核生物は *N* 型糖鎖を切断する酵素を有しており、それは細胞質ペプチド:*N*-グリカナナーゼ (PNGase) と呼ばれている。細胞質 PNGase をコードする遺伝子が出芽酵母で同定された (*PNG1*), その後ヒトでも同定された (*NGLY1*)^{21,22)}。

理論上は PNGase が働かないと ERAD で分解される糖タンパク質は細胞質 (もしくは小胞体) に蓄積すると考えられるが、これまでの研究では、PNGase 遺伝子が機能しないもしくは阻害剤添加時においても異常糖タンパク質の分解は正常に行われているような結果が得られていた²¹⁾。出芽酵母を用

いた ERAD 研究では、ERAD モデル糖タンパク質として CPY* (CPY の 1 アミノ酸変異体) がよく用いられている。その他の ERAD モデル糖タンパク質と同様に、CPY* の糖鎖脱離も確認されていなかった。筆者は、この糖鎖脱離が検出されない理由の 1 つがプロテアソームによらないペプチダーゼ活性による CPY* の切断にあると考えた。もし未知のプロテアーゼが存在し、それが Png1 による糖鎖脱離の前に起こる場合は、CPY* 全長からの糖鎖脱離は検出され難くなるはずである。これを証明するために、CPY* の中間体の検出を試みた。その結果、実際に CPY* 中間体を検出することができた²³⁾。この結果は、未知のプロテアーゼが CPY* を切断する可能性を示している。筆者は、この未知のプロテアーゼの同定を試みているが、現在まだ同定できていない。

6. 今後の展望

以上、酵母の分泌経路 (小胞体→ゴルジ体→細胞外/液胞) に関する知見を紹介してきた。30年以上に渡る研究で多くのことが明らかにされ、多数の遺伝子が同定されており、おおよそのことが分かってきたように見える。しかしながら、筆者は出芽酵母の分泌経路に関する未知の機構を発見した。それは、シグナルペプチド非依存的な小胞体へのタンパク質輸送機構である。分泌経路を通る可溶性のタンパク質は細胞質から小胞体へ入るための目印となる 20~30 アミノ酸残基からなる配列をその N 末端に持っており、これがシグナルペプチドである。このシグナルペプチドのタンパク質輸送における重要性は広く知られている²⁴⁾。しかしながら、非常に興味深いことに、筆者はシグナルペプチド配列を削除した CPY* が小胞体に入り得る (N 型糖鎖付加される) ことを出芽酵母で発見した (未発表データ)。さらに、CPY* のシグナルペプチド非依存的な輸送が促進される株として出芽酵母 *ste24* 遺伝子破壊株を発見した。この結果は、Ste24 タンパク質がシグナルペプチド非依存的な輸送を抑制することを示しており、また、この輸送機構が何かしらの調節を受けていることを示唆している。さらに、これまでの解析で CPY* 以外にも Pep4, Mid1 がシグナルペプチドを削除しても N 型糖鎖付加されることが明らかになってきた (未発表データ)。このように、新たなタンパク質輸送機構が今もなお発見されつつあり、酵母を用いたタンパク質輸送に関する研究の進

展が今後も期待される。

7. 謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金「若手研究 B (23770162) (代表者: 細見昭)」, 「基盤研究 C (25440058) (代表者: 細見昭)」の一環として行われた。本研究を遂行するにあたり有益な御助言と御指導を賜った九州大学農学部の竹川薫教授, 香川大学農学部の田中直孝准教授, 理化学研究所糖鎖代謝学研究チームの鈴木匡チームリーダーに深く感謝申し上げる。

参考文献

- 1) Nielsen, J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: Advances through metabolic engineering. *Bioengineered* 4, 207-211 (2013).
- 2) Novick, P. & Schekman, R. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 1858-1862 (1979).
- 3) Novick, P., Field, C. & Schekman, R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215 (1980).
- 4) Deshaies, R. J. & Schekman, R. A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 105, 633-645 (1987).
- 5) Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M. & Emr, S. D. Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4936-4948 (1988).
- 6) Rothman, J. H., Howald, I. & Stevens, T. H. Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 8, 2057-2065 (1989).
- 7) Bankaitis, V. a, Johnson, L. M. & Emr, S. D. Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 9075-9079 (1986).
- 8) Rothman, J. H. & Stevens, T. H. Protein sorting in yeast: Mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. *Cell* 47, 1041-1051 (1986).
- 9) Bowers, K. & Stevens, T. H. Protein transport

- from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1744, 438-454 (2005).
- 10) Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. & Emr, S. D. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* 77, 579-586 (1994).
 - 11) Cereghino, J. L., Marcusson, E. G. & Emr, S. D. The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol. Biol. Cell* 6, 1089-102 (1995).
 - 12) Cooper, A. A. & Stevens, T. H. Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J. Cell Biol.* 133, 529-541 (1996).
 - 13) Takegawa, K. *et al.* Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Struct. Funct.* 28, 399-417 (2003).
 - 14) Tabuchi, M. *et al.* Vacuolar protein sorting in fission yeast: Cloning, biosynthesis, transport, and processing of carboxypeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 179, 4179-4189 (1997).
 - 15) Iwaki, T. *et al.* Vacuolar protein sorting receptor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 152, 1523-1532 (2006).
 - 16) Burri, L. & Lithgow, T. A complete set of SNAREs in yeast. *Traffic* 5, 45-52 (2004).
 - 17) Kuhlee, A., Raunser, S. & Ungermann, C. Functional homologies in vesicle tethering. *FEBS Lett.* 589, 2487-2497 (2015).
 - 18) Hosomi, A., Higuchi, Y., Yagi, S. & Takegawa, K. Vsl 1 p cooperates with Fsv 1 p for vacuolar protein transport and homotypic fusion in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 161, 89-98 (2015).
 - 19) Hosomi, A., Nakase, M. & Takegawa, K. *Schizosaccharomyces pombe* Pep12p is required for vacuolar protein transport and vacuolar homotypic fusion. *J. Biosci. Bioeng.* 112, 309-314 (2011).
 - 20) Vembar, S. S. & Brodsky, J. L. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 944-957 (2008).
 - 21) Suzuki, T., Park, H., Hollingsworth, N. M., Sternglanz, R. & Lennarz, W. J. PNG 1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide:N-glycanase. *J. Cell Biol.* 149, 1039-1052 (2000).
 - 22) Suzuki, T., Park, H. & Lennarz, W. J. Cytoplasmic peptide : N-glycanase (PNGase) in eukaryotic cells: occurrence, primary structure, and potential functions. *FASEB J.* 16, 635-641 (2002).
 - 23) Hosomi, A. & Suzuki, T. Cytoplasmic peptide : N-glycanase cleaves N-glycans on a carboxypeptidase Y mutant during ERAD in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1850, 612-619 (2015).
 - 24) Kunze, M. & Berger, J. The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance. 6, 1-27 (2015).
-

Intracellular Protein Transport and Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation in Yeast

Akira HOSOMI

Integrated Bioscience Division, Department of Agriculture,
Graduate School of Science and Technology, Shinshu University

Summary

Yeast is a eukaryotic organism. Human have utilized yeast for fermentation since ancient times. So, yeast is a familiar and useful microorganism. On the other hand, yeast is also a useful microorganism for biology (molecular biology and cell biology). There are two advantages to using yeast. The first is ease of culture. The second is commonality of intracellular structure between yeast and human. Therefore, yeast has been utilized for scientific study as a model eukaryotic organism. Comparing with prokaryotic

organisms, eukaryotic organisms contain complicated intracellular structures. The inside of eukaryotic cells is composed of several organelles such as the nucleus, mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes, etc. and cytoplasm. Proteins must be synthesized correctly and transported to appropriate organelles for normal function of each organelle. Therefore, studies on protein synthesis, transport and degradation have been performed actively. In this review, I would like to introduce and discuss intracellular protein transport and endoplasmic reticulum-associated degradation.

Key words: Yeast, Intracellular protein transport, *SEC* genes, *VPS* genes, Endoplasmic reticulum-associated degradation