

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570149

研究課題名(和文) ゴルジ体構造維持タンパク質 golginファミリーによる輸送小胞の運命決定機構

研究課題名(英文) Role of golgins, proteins for Golgi homeostasis, in secretory membrane traffic.

## 研究代表者

三角 佳生 (MISMI, Yoshio)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：10148877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：繫留タンパク質は輸送小胞が標的膜に融合する前に最初の接着を行う因子と考えられている。ゴルジ体に分布する長いcoiled-coil構造を持つ一群のタンパク質で繫留因子と考えられている。本研究ではgolgin-84とp230の2種類のgolginが微小管関連タンパク質と共役することを明らかにした。golgin-84はKif3Cと、p230はMACF1とそれぞれ共役し、ゴルジ体からの輸送に関係していた。繫留因子と微小管関連タンパク質の相互作用は繫留因子が標的膜と小胞の結合だけでなく、小胞輸送の初期の段階で関わることで小胞を正しい目的地へ運ぶ働きを持つことが示された。

研究成果の概要(英文)：A well-accepted role for tethering factors is the initial attachment of transport carriers to acceptor membranes prior to fusion. Golgins, long coiled-coil proteins that localize to particular Golgi subdomains, are candidate tethering factors. In this study, we report that two type of golgins, golgin-84 and p230, interact with microtubule related proteins. Protein interaction analyses have revealed that golgin-84 interact with kinesin2 subunit Kif3C, and plays a role for transport to lysosom from the Golgi. We investigated the role of p230 and microtubule actin crosslinking protein 1 (MACF1), in amino acid starvation-induced membrane transport. p230 or MACF1 knockdown (KD) cells failed to mAtg9 recruitment to phagophores from the TGN. The interaction between a tether and microtubule related protein brings the idea that tethers plays not only in the vesicle tethering process but also in the initial event to direct a vesicle to its correct intracellular destination.

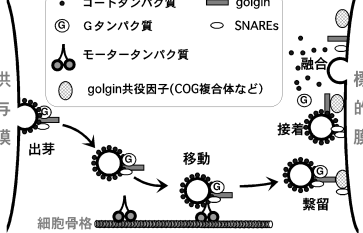
研究分野：生化学

キーワード：細胞小器官 ゴルジ体 小胞輸送 golgins

## 1. 研究開始当初の背景

我々はゴルジ体の構造維持機構の解明のため、ゴルジ体細胞質側に局在するタンパク質を GCP(Golgi cytoplasmic protein)ファミリーとして同定し解析してきた。細胞質に大きな coiled-coil ドメインをもつゴルジ体タンパク質を総称して golgin と呼ぶことが近年提唱され、GCP ファミリーも golgin である。golgin の多くはゴルジ体の構造維持や小胞の繫留(●)に働くと考えられている。我々は小胞の標的膜への最初の接触は繫留タンパク質によることに注目して、小胞繫留機能を持つ golgin を数種類解析した。その結果、golgin である p115 及び golgin-84 と多量体繫留因子 COG 複合体の相互作用を明らかにし、繫留タンパク質が小胞の目的地を決める重要な要素であることを示した(業績 1,6)。出芽した小胞が適切なレールに乗り、目的とする膜と融合する機構を考えた時、繫留タンパク質は小胞を標的膜にファーストコンタクトさせる働きしか持たないのだろうか？小胞の目的地への正確な輸送に関わるタンパク質としては、コートタンパク質、低分子量 G タンパク質、モータータンパク質、SNAREs、繫留タンパク質が挙げられる。その中で ER-ゴルジ体間の輸送小胞の繫留タンパク質である p115 のロックダウンとその相補実験の結果(BBRC 2005,業績 6)から「小胞出芽時に繫留タンパク質が正確な輸送に関わるタンパク質(運命決定因子)の積み込みに働くことで、小胞のその後の運命を決める重要な働きを担うのでは」と考えた。実際、golgin ファミリーには輸送小胞に組み込まれるものが多くみられ、giantin, golgin-84, CASP, p115 は COPI 小胞での存在が確認されている。また多くの golgin は繫留機能とともに低分子量 G タンパク質や SNAREs と相互作用することが知られていて、ゴルジ体の輸送小胞を出芽時に運命付ける機能を持つ可能性が高い(●)。さらに、我々は golgin-84 が特異的なモータータンパク質と相互作用す

ることを新しく見だし解析中である。これは未だ明らかにされていないゴルジ体における輸送小胞とモータータンパク質の結合に具体的にかかわるタンパク質としての golgin の機能の発見につながると共に、繫留タンパク質が小胞の正確な移動に深く関与することを示唆する。



出芽: golginが特異的なGタンパク質と結合、SNAREsの積み込みに働く  
移動: golginが特異的なモータータンパク質と結合、細胞骨格上を動く  
繫留: golginが標的膜上の共役因子(例えばCOG)と結合する  
接着: golginが小胞を標的膜に近づけSNAREの結合がおこる

## 2. 研究の目的

ゴルジ体は細胞内小胞輸送の中心的役割を担う細胞小器官であり物質の移送、タンパク質の選別、修飾をおこなっている。近年、コレステロール合成酵素の転写調節因子がゴルジ体で活性化されることなどゴルジ体がさまざまな細胞内シグナル伝達の調節点としての機能を持つことが示されている。最近、ゴルジ体はオートファゴソーム形成時の膜供給源となり、ゴルジ体局在繫留タンパク質 COG 複合体の関与が示された (Yen et al. JCB 188,101 2010)。以上の観点から、ダイナミックな膜の移動のなかで、ゴルジ体がどのようにその構造と機能を維持しているかを知ることは、細胞の機能調節や細胞内シグナル伝達の理解に必須である。本研究では小胞出芽時に於ける運命決定因子の組み込み機構から小胞の移動と繫留融合までに於て golgin ファミリータンパク質がどのように働くかを解析することを目的とし解析を行う。また coiled-coil 繫留タンパク質 golgin(p115 及び golgin-84)と多量体繫留タンパク質 COG 複合体の相互作用を解析した我々の結果から COG 複合体がシスゴルジへの 2 系統のサブクラス COPI 小胞の輸送に関与することになり、シスゴルジに於ける COG-p115 と COG-golgin-84 の使い分けにもう一つの調節因子の存在が推測された。本研究ではこれらの結果を踏まえて小胞出芽

における golgin の小胞への組み込み機構とその役割及び小胞移動における golgin の役割 (golgin と対応するモータータンパク質) 解析する。

### 3. 研究の方法

本研究に於ては、golgin ファミリータンパク質の中から golgin-84 と p230 に焦点を当てて解析をおこなった。

(1). 小胞出芽時の golgin の COPI 小胞への組み込み機構とその役割解析。

giantin, golgin-84, CASP 3 種の golgin に対する siRNA を用いてそれぞれを KD した細胞において、細胞分画により COPI 小胞を単離する。対照細胞と比較して、どのようなサブクラスの COPI 小胞に変化が見られるかを検討する。対象は SNARE (GS15, GS27, GS28, Syntaxin5a, Vti1 など) と積み荷タンパク質 (CD44, gpp130, KDELr, ERGIC53, p24, Mannosidase II など) と KD 対照以外の golgin である。この結果から giantin, golgin-84, CASP の 3 種の golgin がどの COPI 小胞サブクラスに組み込まれるかを明らかにできる。

対象の golgin は全て C 末に膜結合部位を持ち細胞質側に大きな coiled-coil ドメインを持っている (BBRC 205, 1399, 1994, JBC 2001)。細胞質ドメインの過剰発現は内在の正常 golgin と競合することで golgin の機能と局在を阻害することが期待される。それぞれの golgin の細胞質ドメインを培養細胞で過剰発現、小胞の変化を a. の結果を踏まえて検討する。

(2). golgin タンパク質と対応するモータータンパク質の解析。

golgin-84 と Kinesin2 の相互作用の解析。

これまでの解析で golgin-84 が Kinesin2 と結合することを見いだしている。この結合がどのような小胞で起こるのかを Kinesin2 KD 細胞及び未処理

細胞を用いて解析する。

他の golgin の解析。

一方、golgin-84 相互作用タンパク質 COG 複合体がトランス golgin で有る p230 と共局在を示す事を見いだした。COG 複合体は酵母細胞においてファゴフォア形成にかかわることが報告されている。この結果を踏まえて共役因子である golgin-84 や他の golgin の KD 細胞におけるオートファゴソーム形成についての解析を行う。

### 4. 研究成果

(1) golgin-84 とその共役タンパク質

golgin-84 のゴルジ体局在に必要なドメインの解析。

golgin-84 は N 末側に球状の head ドメインを、そのあとに coiled-coil 構造の尾部と c 末の膜貫通ドメインとそれに続く短い細胞質ドメインを持っている。欠失変異株の発現実験により coiled-coil ドメインの 581-640 アミノ酸がゴルジ体局在に必須であった。この領域は細胞内で

2 量体を作るのに働いていて、golgin-84 の局在には 2 量体形成が必須と考

えられる (図 1)。

ゴルジ体局在に必要なドメインと相互作用をもつタンパク質の検索。

golgin-84 の局在化ドメインの 581-640 アミノ酸領域に相互作用するタンパク質の検索のため、同領域を Bait にして HeLa 細胞 cDNA ライブラリーに対して酵母 two-hybrid スクリーニングを

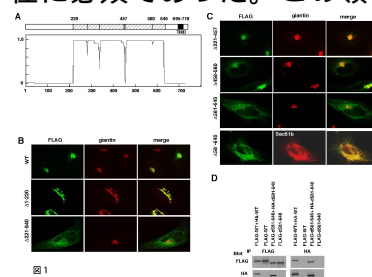


図 1

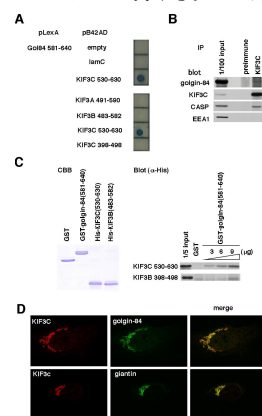


図 2

行った。結果 5 種類の異なったクローンが得られた。そのうち他の方法による共役が確認できたクローン C7 について解析を進めた。クローン C7 は kinesin2 のサブユニットである Kif3C の 530-630 アミノ酸をコードしていた。golgin-84 との Co-IP、in vitro pull-down で相互作用が確認できた。この相互作用は Kif3C 特異的であり Kinesin2 他のサブユニットとは相互作用は見られなかった(図 2)。Kif3C と golgin-84 はゴルジ体において共局在が確認された

golgin-84 と相互作用する Kinesin2 サブファミリーの働き。

Kinesin2 は Kif3A+Kif3B と Kif3A+Kif3C のふたつのサブファミリーからなり、前者はゴルジ体から小胞体への逆輸送に、後者はゴルジ体から外側への正方向輸送に働いているとされている。Kif3A+Kif3B にくらべると Kif3C を持つ kinesin2 は解析が進んで居ない。kif3C の KD 細胞における各オルガ

ネラタンパク質の挙動を調べたところ、Kif3C KD 細胞ではライソゾームタンパク質 lamp1 の増加が観察された。

一方 Kif3B の KD 細胞では形質膜タンパク質 CD44 の増加は見られたが lamp1 の増加は観察されなかった(図 3)。Kif3C の KD 細胞では lamp1 はライソゾームより小さな構造に分布していた(図 4) おそらく

エンドソームであろうと考えられるが、TfR とは局在が一致しなかった。また golgin-84 の Kif3C 結合部位を

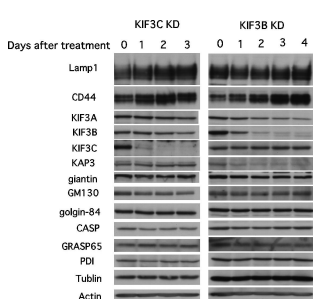


図 3

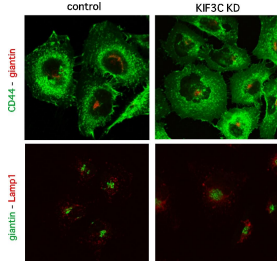


図 4

過剰発現することで、Kif3C の KD と同様の現象が観察された、これらの結果は golgin-84 と Kif3C はポストゴルジの小胞輸送に関係していることを示唆する。

(2)p230 とその共役タンパク質。

我々は哺乳動物細胞においても COG 複合体サブユニット Cog3 ノックダウン (KD) 細胞ではオートファゴソーム形成が阻害されることを確認した。一方、golgin-84 相互作用タンパク質 COG 複合体がトランス golgin で有る p230 と共局在を示す事を見いだした。この結果を踏まえて p230KD 細胞におけるオートファ

ゴソーム形成についての解析を行った。その結果 p230 がオートファジイの過程に深く関係していることを示した。

p230 とその共役タンパク質 MACF1 はオートファジイの過程にかかわっている。

p230 は TGN に局在する golgin で、C 末にある GRIP ドメインで膜に結合している。

p230 はその共役タンパク質と共にゴルジ体から形質膜への膜輸送に関係することが報告されている。我々は p230 と MACF1 を siRNA を用いて KD すると、オートファジイ過程が阻害されることを見いだした。p230 または MACF1 を欠失させても互いのタンパク質の含量は変化しなかった(図 5)。このことは、それぞれのタンパク質の共役作用がオートファジイ過程と関係することを示唆する。

p230 または MACF1 の欠失は mAtg9 の輸送を阻害する

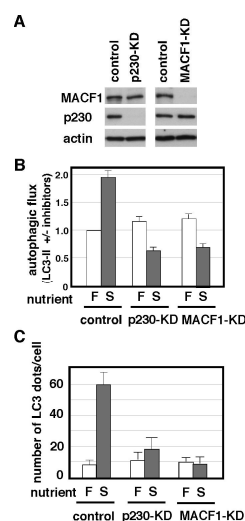


図 5

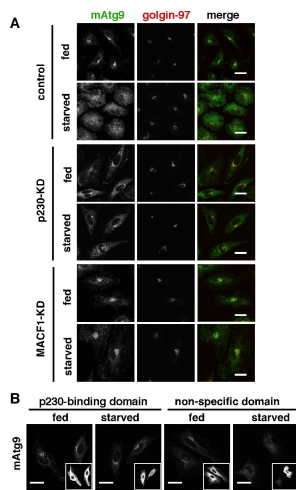


図6

結果オートファジイ関連タンパク質 mAtg9 のゴルジ体からファゴソームへの輸送に関係することを見いだした。mAtg9 はゴルジ体とエンドソームに局在しており、飢餓シグナルによりゴルジ体から消失することが知られているが、p230 または MACF1 KD 細胞においては飢餓シグナルによってもゴルジ体局在が変わらないことが認められた。またこの変化は MACF1 の p230 結合ドメインの過剰発現によるドミナントネガティブ効果によっても見いだされた(図6)。これらの結果から mAtg9

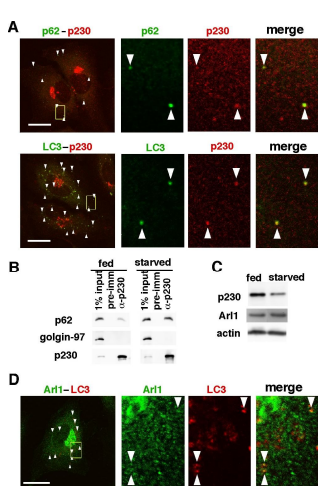


図7

p230 は形質膜を經由してオートファゴソームに移行していく p230 はオートファゴソーム形成過程でオートファジイ関連タンパク質 p62 や LC3 陽性の構造へ移行して最終的にオートライソソームにおいて分解されることを見いだした(図8)。また p230 はその移行過程

p230 と MACF1 はオートファジイ過程と深く関わりがあるとされている SNARE タンパク質 VAMP7 の輸送と深く関係することが報告されているが、それ以外のオートファジイ関連タンパク質の輸送について検討してみた。その

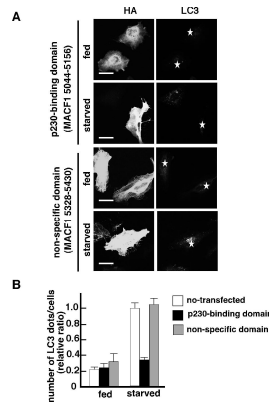


図8

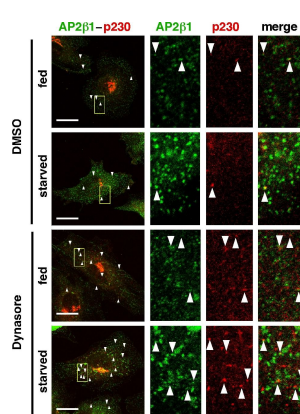


図9

も重要な働きを担う可能性を示唆する。(3)まとめ  
本研究により明らかにされた、golgin-84 と p230 の解析結果はゴルジ体トランス領域に於ても golgin タンパク質が小胞やその積み荷の行き先決定に関与していることを強く示している。golgin タンパク質は小胞の繫留に働くだけでなく、微小管関連タンパク質と相互作用をすることにより小胞の移行に関わることが示された。これらの結果は「小胞輸送の正確さ」を保つ機構における golgin ファミリーの機能一端を明らかにした。これ以外の繫留に関する golgin についての解析が必要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. Ishida R, Yamamoto A, Nakayama K, Sohda M, Misumi Y, Yasunaga T, Nakamura N. FEBS J. 2015

Mar 18. doi: 10.1111/febs.13271.  
査読有り  
*Trans-Golgi* protein  
p230/golgin-245 is involved in  
phagophore formation. Sohda M,  
Misumi Y, Ogata S, Sakisaka S,  
Hirose S, Ikehara Y and Oda K.  
Biochem. Biophys. Res Commun.  
2015 456(1):275-281, doi: 10.1016/  
j.bbrc.2014.11.071. 査読有り  
Association of nonsense mutation  
in GABRG2 with abnormal  
trafficking of GABAA receptors in  
severe epilepsy. Ishii A, Kanaumi T,  
Sohda M, Misumi Y, Zhang B,  
Kakinuma N, Haga Y, Watanabe  
K, Takeda S, Okada M, Ueno S,  
Kaneko S, Takashima S, Hirose S.  
Epilepsy Res. 2014 Mar;108(3):  
420-432. doi: 10.1016/j.epilepsyres.  
2013.12.005. 査読有り  
Identification of a soluble isoform  
of human IL-17RA generated by  
alternative splicing. Sohda M,  
Misumi Y, Tashiro K, Yamazaki M,  
Saku T, Oda K. Cytokine. 2013  
Dec;64(3):642-645. doi: 10.1016/j.  
cyto.2013.09.012. 査読有り  
A new role for RINT-1 in SNARE  
complex assembly at the trans-Golgi  
network in coordination with the COG  
complex. Arasaki K, Takagi D, Furuno  
A, Sohda M, Misumi Y, Wakana Y,  
Inoue H, Tagaya M. Mol Biol Cell.  
2013 Sep;24(18):2907-2917. doi: 10.  
1091/mbc.E13-01-0014. 査読有り  
A human Dravet syndrome model from  
patient induced pluripotent stem cells.  
Higurashi N, Uchida T, Lossin C,  
Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W,  
Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K,  
Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka  
Y, Okano H, Hirose S. Mol Brain. 2013  
May 2;6-19. doi: 10.1186/1756-6606-  
6-19. 査読有り  
Construction of new cloning vectors  
that employ the phytoene synthase  
encoding gene for color screening of  
cloned DNA inserts in *Thermus*

*thermophilus* Fujita A, Misumi Y,  
Honda S, Sato T, Koyama Y. Gene  
2013 Sep 25;527(2):655-662. doi:  
10.1016/j.gene.2013.06.069. Epub  
2013 Jul 9. 査読有り  
Two versatile shuttle vectors for  
*Thermus thermophilus*-*Escherichia coli*  
containing multiple cloning sites, lacZ $\alpha$   
gene and kanamycin or hygromycin  
resistance marker. Fujita A, Misumi Y,  
Koyama Y. Plasmid. 2012  
May;67(3):272-275. doi:10.1016/  
j.plasmid.2011.12.013 査読有り  
Characterization of YIPF3 and  
YIPF4, cis-Golgi localizing Yip  
domain family proteins. Tanimoto  
K, Suzuki K, Jokitalo E, Sakai N,  
Sakaguchi T, Tamura D, Fujii G,  
Aoki K, Takada S, Ishida R,  
Tanabe M, Itoh H, Yoneda Y,  
Sohda M, Misumi Y, Nakamura N.  
Cell Struct Funct. 2011 Sep  
1;36(2):171-85. doi:10.1247/cs.f.  
11002. 査読有り

〔図書〕(計0件)  
〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕無し  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
三角 佳生 (MISUMI, Yoshio)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10148877  
(2) 研究分担者  
無し  
(3) 連携研究者  
相田 美和 (SOHDA, Miwa)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 20258528