

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570234

研究課題名(和文) ゴルジ体再構成における VCIP135 の機能の解明

研究課題名(英文) Role of VCIP135 in Golgi reorganization

研究代表者

十津川 剛 (Totsukawa, Go)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90399684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体形成必須因子として機能する VCIP135 脱ユビキチン酵素と複合体を形成する新規タンパク質 WAC を同定し、その機能解析をおこなった。WAC は、VCIP135 の脱ユビキチン活性を活性化し、ゴルジ体再構成における p97/p47 膜融合経路において必須因子として機能する一方、p97/p37 膜融合経路では機能しない事を明らかにした。また、小胞体形成においては WAC が機能していない事を見出した。これらの結果は、WAC/VCIP135/ユビキチンを介した分子機構が、細胞分裂期のゴルジ体再構成に特異的に働いている事を強く示すものである。

研究成果の概要(英文)：A novel VCIP135 binding protein is identified as WAC. WAC directly binds to VCIP135, and activates deubiquitinase activity of VCIP135 in vitro. WAC localizes to the Golgi, and functions as an essential factor for Golgi biogenesis. Interestingly, in Golgi reassembly, WAC functions only in p97/p47 membrane fusion pathway, but not in p97/p37 membrane fusion pathway. On the other hand, WAC has no function in ER biogenesis at all. It is suggested that ubiquitin signaling mediated by VCIP135/WAC plays a specific role in Golgi biogenesis, especially in mitosis.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 VCIP135 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では、細胞分裂期におけるゴルジ体再構成において、p97 ATPase / p47 を介した膜融合経路が必須であることを明らかにしてきた。近年、申請者は新たに p47 と相同性の高い新規タンパク質、p37 を同定し、p37 がゴルジ体形成必須因子である事を明らかにした。この p37 の同定により、細胞は、p97/p47 経路と p97/p37 経路の2つの異なる膜融合経路を用いてゴルジ体形成をおこなっていることが明らかとなり、さらにこの2つの経路を比較する事で大変興味深い事が明らかとなった。1つが、細胞は膜融合経路を細胞周期により使い分けている事である。p97/p37 経路が間期におけるゴルジ体の形成維持に使われるのに対し、p97/p47 経路は細胞分裂期におけるゴルジ体の再構成に特化した膜融合経路である。もう1つは VCIP135 の関与である。VCIP135 はゴルジ体形成必須因子として同定したタンパク質であり、脱ユビキチン活性を持つ。この2つの膜融合経路はともに VCIP135 を必須因子として必要とする。しかしその脱ユビキチン活性については、p97/p37 経路では必要ないのに対し、p97/p47 経路では脱ユビキチン活性を必要とする。これは明らかにゴルジ体形成において、VCIP135 が異なる機能を有するタンパク質である事を示している。VCIP135 の機能を明らかにする事は、ゴルジ体形成の分子機構を明らかにするうえで重要な知見を与えるものと考えられる。

2. 研究の目的

ゴルジ体は、新たに合成されたタンパク質の修飾、選別、輸送の中心的な役割を担う細胞内小器官(オルガネラ)である。ゴルジ体の形態は扁平膜が積層した非常に特徴的な構造を示す。この扁平膜積層構造は広く生物種間で保存されており、その高次構造がゴルジ体の機能と密接に関連していると考えら

れている。また、ゴルジ体は細胞分裂期において劇的な形態変化を起こす事が知られている。間期の細胞では扁平膜積層構造を示すが、細胞分裂期において、扁平膜積層構造が消失して多数の小胞に断片化され、細胞分裂後の娘細胞において扁平膜積層構造が新たに再構成される。しかしながら、なぜそのような小胞化から再構成というプロセスを踏むのか、その生物学的意義は解明されておらず、また、どのようにしてその特徴的な扁平膜積層構造を形成するのか、その分子機構についても未だに不明な点が多い。本研究では、ゴルジ体形成の必須因子である VCIP135 に着目し、VCIP135 によるゴルジ体形成の分子機構を明らかにすることにより、ゴルジ体の扁平膜積層構造の形成機構の解明を目的とする。非常に特徴的である扁平膜積層構造の形成機構の解明は、ゴルジ体の機能を理解する上で必要不可欠であると考えられる。

3. 研究の方法

1) VCIP135 の脱ユビキチン活性化タンパク質、p87 の機能解析

p87 はゴルジ体に局在を示す事から p87 もゴルジ体形成に関与する事が予想される。そこでまず、*in vivo* における機能を確認するため、培養細胞を用い、RNAi を用いたジーンノックダウンによるゴルジ体形態形成への効果を免疫染色、または電子顕微鏡を用いて検討する。一方、*in vitro* における機能について、試験管内ゴルジ再構成アッセイを用いて、ゴルジ体形態形成における役割を検討する。この手法は試験管内でゴルジ体の扁平膜積層構造を再構成できる手法であり、前述の様に RNAi では評価の難しい「一分子」の機能を「直接的」に解析することが可能である。

また、p87 はゴルジ体に局在するが、分子内に膜貫通領域は存在せず、また膜局在修飾モチーフも無いと思われることから、ゴル

ジ体膜上に p87 結合タンパク質 (p87 レセプター) の存在が予想される。ゴルジ体膜上の p87 を含む複合体を p87 の免疫沈降によって回収し、質量分析を用いて同定する。このゴルジ体上の p87 レセプター分子もゴルジ体再構成に重要な役割を果たしている可能性があると考えている。

4. 研究成果

1) 新規脱ユビキチン化酵素複合体を同定し、その機能解析を行った。新規 VCIP135 結合タンパク質 p87 を WAC と同定し、WAC がユビキタスに発現し、細胞内では主にゴルジ体に局在している事を明らかにした。WAC は、ゴルジ体において VCIP135 および p97 と三者で複合体を形成する事を示し、また、VCIP135 の脱ユビキチン活性は、WAC との結合により活性化する事を見出した。さらに、RNAi による WAC のノックダウン実験から、WAC がゴルジ体形成の必須因子である事を明らかにした。試験管内ゴルジ体再構成実験から、ゴルジ体再構成における p97/p47 膜融合経路において WAC が必須因子として機能する一方、p97/p37 膜融合経路では機能しない事を併せて明らかにした。一方、小胞体形成においては WAC が機能していない事も見出した。これらの結果は、p97/p47 膜融合経路および WAC を介した VCIP135 の脱ユビキチン活性が、細胞分裂期のゴルジ体再構成に特異的に働いている事を強く示している。

2) 細胞分裂期におけるゴルジ体膜融合を阻害するための新たな機構を発見した。オルガネラ形成の必須因子である VCIP135 が、細胞分裂期特異的に cdc2 キナーゼによりリン酸化を受けている事を見出し、そのリン酸化サイトをスレオニン760、セリン767 と同定した。このリン酸化サイトの疑似リン酸化変異体 (T760E, S767E) は、p97 との結合能を示さず、試験管内ゴルジ体再構成実験系においてゴルジ体再構成を顕著に阻害した。免疫沈降法により分裂期において VCIP135 と p97 の結合

が顕著に減少していることを確認した。これらの結果から、細胞分裂期に入ると VCIP135 が cdc2 キナーゼによりリン酸化を受け p97 との結合が阻害され、その結果、p97 による膜融合が阻害されていると考えられる。細胞分裂期におけるゴルジ体膜融合を阻害するための機構の一つであると考えられる。

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 2 件)

1. Totsukawa, G., Matsuo, A., Kubota, A., Taguchi, Y., and Kondo, H. (2013) Mitotic phosphorylation of VCIP135 blocks p97ATPase-mediated Golgi membrane fusion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 433(2), 237-42. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.090.
2. Totsukawa, G., Kaneko, Y., Uchiyama, K., Toh, H., Tamura, K., and Kondo, H. (2011) VCIP135 deubiquitinase and its binding protein, WAC, in p97ATPase-mediated membrane fusion. *EMBO Journal* 30(17), 3581-3593. doi: 10.1038/emboj.2011.260.

[学会発表](計 2 件)

1. 十津川剛、金子弥生、近藤久雄 (2013.12) p97 ATPase 膜融合機構によるゴルジ体形成の新規必須因子、第36回日本分子生物学会年会、ワークショップ「細胞内機能場におけるプレイヤーの解析から見えてくる機能的ミッシングリンク」、神戸市
2. Go Totsukawa, Yayoi Kaneko, Kaori Tamura, Hisao Kondo (2011.12) VCIP135 deubiquitinase and its binding

protein, WAC, in p97 ATPase-mediated membrane fusion. The 10th Global COE International Symposium
“Biochemistry and Cell Biology”,
National University of Singapore,
Singapore

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

十津川 剛 (TOTSUKAWA, GO)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：90399684