

平成21年 5月 20日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570195

研究課題名 (和文) p97/p37 新規膜融合経路に関する研究 -SNARE 複合体の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and function analysis of a SNARE complex for p97/p37-mediated membrane fusion pathway

研究代表者

内山 圭司 (UCHIYAMA KEIJI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号：60294039

研究成果の概要：

p97/p37経路は細胞周期間期におけるゴルジ体と小胞体の維持に必須であるが、本研究ではゴルジ体を対象としてSNARE分子の同定を試みた。CHAPSにより可溶化することで、ショ糖密度勾配遠心分離により、p97, p37, SNARE分子よりなると考えられる複合体を維持したまま高密度側に分離し、低密度画分のGS15やp37分子と分離することに成功した。また、CHAPSにより可溶化したゴルジ体よりp97/p37ピーズに特異的に結合する分子量約30, 28, 23, 18kDaの因子を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞構造・機能、細胞内膜融合

1. 研究開始当初の背景

細胞周期間期においてゴルジ体は、核近傍に扁平な膜構造物が積層した非常に特徴的な形態を有している。ゴルジ体は、細胞分裂期に入ると断片化・小胞化し細胞質全体に分散し、細胞分裂期後期において再びその特徴的な構造が再構成される。申請者は、これまでにこの細胞分裂期におけるゴルジ体の再構成に必須な膜融合経路である p97 膜融合経

路に関する研究を行い、新規必須因子 VCIP135 を同定しその機能を解明した (Uchiyama et al., JCB, 2002)。また、p97 経路の必須因子である p47 の細胞分裂期初期でのリン酸化が、ゴルジ体の断片化・小胞化に必須であることを明らかにした。そして、そのリン酸化を阻害することにより分裂期においてもゴルジ体特有の層盤積層構造を維持することに成功し、さらに、この様な

ゴルジ体でさえ娘細胞に均等に分配されることを示し、ゴルジ体の断片化・小胞化は、娘細胞への均等分配には必須でないことを明らかにしてきた (Uchiyama et al., JCB, 2003)。

これらの研究過程において、分裂期でのゴルジ体再構成に必須な p47 に対する抗体を分裂期初期の生細胞にマイクロインジェクションにより注入することにより、分裂期後期でのゴルジ体再構成を抑制することに成功していたが、同様の操作を間期細胞に行ってもゴルジ体の断片化・小胞化は見られなかった。一方、間期細胞において p97 はゴルジ体に局在していることを明らかにしており、このような結果を踏まえ、間期細胞におけるゴルジ体の構造維持には p47 とは異なる補因子を必要とする新規の膜融合経路が存在しているのではないかと考えその同定を試みた。その結果、新規 p97 結合蛋白質 p37 を同定した。この p37 は、間期においてゴルジ体・小胞体に局在し、p37 に対する抗体をマイクロインジェクションにより間期細胞の細胞質に注入すると、小胞体の網状構造は崩壊し、ゴルジ体は断片化・小胞化し、この p37 が間期における小胞体・ゴルジ体の構造維持に必須であり、p47 を用いる p97/p47 膜融合経路とは全く異なる新規の膜融合経路であることを明らかにした (Developmental Cell, 2006)。

しかし、p97/p47 経路、p97/p37 経路ともにゴルジ体・小胞体、両オルガネラの形成・維持に必須な経路であり、各々のオルガネラが独立したものとして形成・維持される機構、そのために必要な因子は明らかでなかった。

2. 研究の目的

p97 を介する膜融合経路に関して、p47 を用いる p97/p47 経路と p37 を用いる p97/p37 経路が存在しており、前者が分裂期後期、後者は間期におけるゴルジ体・小胞体の形成・維持に重要な膜融合機構であることを明らかとしてきた。しかし、どちらの膜融合経路もゴルジ体・小胞体の形成・維持に関して共通して用いられる膜融合経路である。つまり、これまでに同定してきた必須因子 p97、p47、p37、VCIP135 だけでは、小胞体・ゴルジ体を独立した細胞内小器官としてその独自性を

説明することが出来ない。その形成・維持機構には各々に特有の機構が備わっているはずであり、このような細胞内小器官の独自性を維持するための機構の解明を目指す。

これまで、p97、p47、p37、VCIP135 は、膜融合機構に対して必要かつ十分な細胞質成分であることを示してきた。つまり、小胞体・ゴルジ体維持機構の違いを与える因子は、小胞体・ゴルジ体膜に存在しているはずである。そのような因子の代表的なものに膜上の受容体タンパク質群 (SNARE 複合体) が考えられる。この SNARE 複合体は、膜融合機構の中心的な役割を担い、膜融合の正確性を保つ上でも欠くことのできない分子群であると考えられているが、p97/p47 および p97/p37 膜融合経路に関しては、その全貌が全く明らかとはなっていない。そこで、本申請課題においては、まず、p97/p37 膜融合経路に対するゴルジ体の SNARE 複合体を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ショ糖密度勾配遠心分離によるゴルジ体可溶化成分の分画

調製時に 1M KCl を含む緩衝液により処理することで塩に対して感受性を示す膜結合タンパク質を除去したゴルジ体 (sw-Golgi)、または、sw-Golgi に p97/p37 複合体を結合させたゴルジ体 (p97/p37/sw-Golgi) を buffer A (20mM HEPES (pH7.4), 0.2M KCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, 1% CHAPS, 5% Glycerol) により可溶化した。この可溶化成分を 5-30% ショ糖密度 (20mM HEPES (pH7.4), 0.1M KCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, 0.2% CHAPS, 5-30% sucrose) の最上層に加えた後、VTi65.2 rotor (Beckman) により遠心分離 (65krpm, 50min) を行いゴルジ体可溶化成分の分画をおこなった。

(2) p97/p37-beads の作製

ビオチン化した p37 とアビジンビーズを 4°C で 2 時間混合したのち、遠心分離によりビーズを回収した。このビーズにはビオチン-アビジン結合を介した p37 が結合しているが、非特異的結合や弱い結合でビーズに結合している p37 を取り除くために少なくとも 3 度洗浄し、p37-beads を得た。次に、p37-beads に p97 を加え、先と同様、4°C で 2 時間混合、

洗淨することにより p97/p37-beads を作製した。

(3) sw-Golgi からの結合因子の取得

1mg のタンパク質を含む sw-Golgi を extraction buffer (20mM HEPES (pH7.4), 0.2M KCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, 5% Glycerol, 2% CHAPS, 1mM ATP, protease inhibitor cocktail) に懸濁したのち、4°C で 1 時間混合した。これを、4°C で遠心分離 (16,000xg, 20min) し、その上静画分を sw-Golgi extract とした。この sw-Golgi に p97/p37-beads を加えた後、sw-Golgi extract と等量の dilution buffer (20mM HEPES (pH7.4), 0.2M KCl, 1mM DTT, 1mM MgCl₂, 5% Glycerol, 1mM ATP) を加え、4°C で少なくとも 4 時間混合した。その後、ビーズを回収、洗淨することにより結合因子を得た。

4. 研究成果

(1) ショ糖密度勾配遠心分離による p97/p37/SNARE 複合体の分画と SNARE 分子の同定

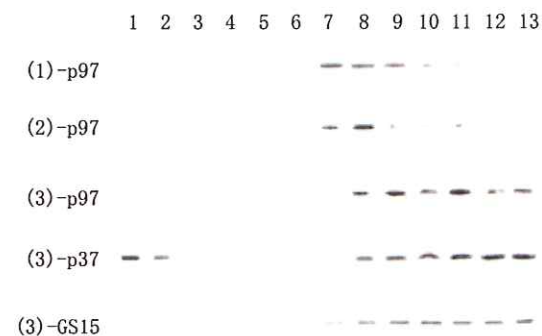
p97/p37 膜融合経路に関して、必須 SNARE 分子はこれまで GS15 しか明らかになっていない (Uchiyama et al., Dev. Cell, 2006)。しかし、膜融合が進行するためにはこれ以外の SNARE 分子も必要である。そこで、本研究では、p97/p37 膜融合経路に必要な SNARE 複合体の同定と機能解析を目指し、ゴルジ体上の p37 結合因子の取得を試みた。

これまでの結果 (Uchiyama et al., Dev. Cell, 2006) より、p97 は、アダプターである p37 を解してゴルジ体上の SNARE と複合体を形成していると考えられた。そこで、この p97/p37/SNARE を分離することで p97/p37 経路の SNARE 複合体を同定することにした。図 1-(1) に示すように、p97 は 6 量体を形成し、ショ糖密度勾配遠心分離により、p97 単独でも高密度側に分布する。これに対して、p37 は 3 量体を形成していると考えられるが、これでも分子量約 100kDa 程度であり低密度側に見られる。そこで、p97/p37/SNARE 複合体を形成した後、これをショ糖密度勾配遠心分離により分離し高密度側に現れる p37、p97、および GS15 を含む画分に対して、抗 p37 抗体により免疫沈降を行えば、p97/p37/SNARE 複合体が得られるのではと考えた。まず、間期細胞のゴルジ体

を 1M KCl で処理し、すでに結合している内在性の p37 や p97 を除去したゴルジ体 (sw-Golgi) を調製した。これに p97/p37 複合体を結合させることにより p97/p37/sw-Golgi 複合体を形成した。そして、この p97/p37/sw-Golgi を可溶化し、ショ糖密度勾配遠心分離により分画し各々の因子がどの様に分布しているのかを確認した。ここで、p97/p37/sw-Golgi の可溶化に当たり、種々の界面活性剤により可溶化した後、抗 p37 抗体または抗 GS15 抗体を用いた免疫沈降を行い他の因子 (抗 p37 抗体の場合は GS15、抗 GS15 抗体の場合は p37) が共沈殿されることを確認することにより、可溶化によっても複合体が維持されていることを確認した。結果、CHAPS が最も可溶化効率がよく複合体も維持されることが明らかとなったので、以後の実験では CHAPS を用いることとした。

p97/p37/sw-Golgi 可溶化成分のショ糖密度勾配遠心分離による分画の結果を図 1 にしめす。p97 単独では、p97 分布のピークはフラクション No. 7 にあることが分かる。また、p97/p37 複合体の場合は、p37 の影響でそのピークが高密度側へシフトし、フラクション No. 8 へ移動していることがわかる。これらに対して、p97/p37/sw-Golgi 可溶化成分の分画結果を見ると、フラクション No. 9 と 11 の 2 箇所ピークが現れていることがわかる。低密度側のピーク (No. 9) は、p97/p37 複合体が SNARE 複合体と遠心分離途中で解離した結果 p97/p37 複合体の場合よりも若干高密度側に現れたピークであると考えられるが、ピーク No. 11 は、p97/p37/SNARE 複合体よりなると考えられた。GS15 は単独である場合、多量体を形成しているとは考えられていない。つまり、GS15 が他の因子と複合体を形成せず単独である場合、分子量約 15kDa と小さいため、ショ糖密度勾配遠心分離を行っても高密度側では見られないと考えられる。しかし、図 1 (3)-GS15 を見るとその分布はフラクション No. 10-11 にピークを持ち非常に高密度側に分布している。このことは、GS15 が他の因子と非常に大きな複合体を形成していることを示唆するものであり、p97 の分布を考え合わせると、フラクション No. 11 は、p97/p37/SNARE 複

合体を含むフラクションであることが強く示唆された。そこで、このフラクションを用い、抗p37抗体による免疫沈降を行ったが、SNARE分子の同定には至らなかった。この理由として、抗体のheavy chainやlight chainさらにはp97やp37分解物の影響が考えられたので、抗体を用いずにSNARE分子を同定することにした。



(図1) ショ糖密度遠心分離による p97/p37/sw-Golgi extract の分画

(1)p97 単独でのショ糖密度勾配遠心分離における p97 の分布、(2)p97/p37 複合体のショ糖密度勾配遠心分離における p97 の分布、(3)p97/p37/swG 可溶化成分のショ糖密度勾配遠心分離における p97、p37 および GS15 の分布。

(2) p97/p37-beads による SNARE 分子の取得

ショ糖密度勾配遠心分離による p97/p37/sw-Golgi 可溶化成分の分画結果より、GS15 は何らかの因子と結合し非常に大きな複合体を形成しており、この複合体を含むフラクションには p97 と p37 も含まれていることから、p97、p37、および GS15 を含む SNARE 複合体が非常に大きな複合体を形成していることが示唆された。しかし、この複合体を抗 p37 抗体や抗 GS15 抗体を用いた免疫沈降により分離しても、SNARE 分子の同定には至らなかった。この理由として、SNARE 分子はそのほとんどが分子量 15-40kDa であり、抗体や p37、p97 の分解物に由来するバンドに隠れたためではないかと考えられた。そこで、この様な影響を極力抑えるために、免疫沈降による分離ではなく、ビオチン-アビジン結

合を利用した p97/p37-beads を用いることとした。また、ショ糖密度勾配遠心分離により、可溶化後も GS15 を含む複合体は維持されていることが明らかとなったため、sw-Golgi を可溶化した後に p97/p37-beads を加えても、p97/p37-beads 上で複合体を形成し、目的とする SNARE 複合体の取得は可能であると考えられた。

sw-Golgi を 2% CHAPS を含む extraction buffer で可溶化したのち、p97/p37-beads を加えた後に、dilution buffer を加え CHAPS 濃度を 1% とすることにより、界面活性剤による結合の阻害を低減し、より効率的に目的とする SNARE 複合体の取得を行った。結果、図 2 に示す様に、分子量 30kDa (p30)、28kDa (p28)、23kDa (p23)、18kDa (p18)、15kDa (p15) の 5 つが p97/p37-beads に特異的に結合するものとして得られた。このうち、p15 が分子量から GS15 であると思われるが、他の 4 つ (p30, p28, p23, p18) については新規因子であると思われ、その大きさから SNARE 分子である可能性が非常に高いと考えられた。そこで、ゲルよりバンドを切り出しマススペクトロメトリーによりその同定を試みたがタンパク量の不足と夾雑タンパク質の影響でその同定には至らなかった。

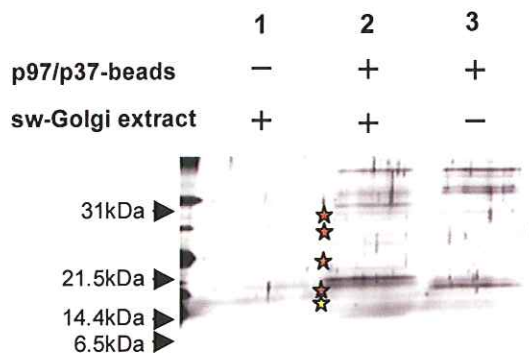


図2 salt washed-Golgi 可溶化成分からの p97/p37 結合タンパク質の取得。

☆印は、p97/p37-beads に特異的に結合しているタンパク質のバンドを示す。黄色は、GS15 と思われるバンドを示す。赤は今回新たに取得された因子であると思われるバンドを示す。

本研究では、SNARE 複合体の同定を目的としてその同定に必要な可溶化と複合体の維持に CHAPS を用いることが非常に有効であることが示された。また、ゴルジ体の可溶化成分と p97/p37-beads を混合することによっても SNARE 複合体の取得は可能であると示唆された。これらの結果は、p97/p37 経路における SNARE 複合体の同定だけでなく他の SNARE 複合体の同定においても非常に有効な手段であり、他の膜融合機構の解明においても有効な手法であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

近藤久雄、内山圭司、十津川剛、細胞内小器官維持のための新たな分子機構、実験医学、25 巻、p848-p851、2007、査読無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 圭司 (UCHIYAMA KEIJI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授
研究者番号：60294039