

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370082

研究課題名(和文) p97ATPase膜融合における脱ユビキチン化酵素VCIP135の作用機序

研究課題名(英文) The function of VCIP135 in p97ATPase-mediated membrane fusion.

## 研究代表者

近藤 久雄 (Kondo, Hisao)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20205561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂期にゴルジ体は消失し、娘細胞にて再構成される。この細胞分裂期におけるゴルジ体の消失のためには、細胞内膜融合機構p97/p47経路の阻害が必要である。本研究で、細胞分裂期にVCIP135がリン酸化されることを見出した。VCIP135の細胞分裂期リン酸化部位は760番目のスレオニンと767番目のセリンであり、この細胞分裂期におけるVCIP135のリン酸化修飾はVCIP135のp97に対する結合能を減弱させた。これが、細胞分裂期におけるp97/p47経路の阻害のための分子機構であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The Golgi apparatus is disassembled early mitosis. For Golgi disassembly, membrane fusion needs to be blocked. Golgi biogenesis requires the p97/p47 pathway. We previously reported that p47 phosphorylation on Serine-140 result in mitotic inhibition of the p97/p47 pathway. In this study, we show another mechanism of mitotic inhibition of p97-mediated Golgi membrane fusion. We clarified that VCIP135, an essential factor in both p97 membrane fusion pathways, is phosphorylated on Threonine-760 and Serine-767 by Cdc2 at mitosis and that this phosphorylated VCIP135 does not bind to p97. An in vitro Golgi reassembly assay revealed that VCIP135(T760E,S767E), which mimics mitotic phosphorylation, caused no cisternal regrowth. Our results indicate that the phosphorylation of VCIP135 on Threonine-760 and Serine-767 inhibits p97-mediated Golgi membrane fusion at mitosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膜融合 ゴルジ体

## 1. 研究開始当初の背景

分泌蛋白質や膜蛋白質は、細胞内の小胞体にて mRNA から生成され折りたたまれた後に、ゴルジ体へ送られ、そこで修飾・選別された後に種々の目的地へ送り出される。まさに小胞体・ゴルジ体は細胞機能の根幹を司る細胞内小器官であるが、その形態は大変に特徴的で、小胞体は網状構造を、ゴルジ体は扁平膜積層構造をとっている。しかるに、それら細胞内小器官の形成機構は依然として不明であり、その異常による病態意義も明らかになっていない。

申請者は、このような小胞体やゴルジ体の特徴的な構造形成を分子レベルで明らかにすること、並びにその特徴的構造と固有機能の関連性の解明を目指して、p97ATPase 膜融合機構の研究を現在まで 15 年以上続けてきた。p97ATPase による膜融合機構には p97/p47 経路と p97/p37 経路の二つがあるが、この二つの経路を発見したのは申請者であり、両経路に含まれる因子群も全て我々が発見したものである(図1)。

申請者はまず p97 の最初の補因子として p47 を見つけ、p97/p47 膜融合経路を発見した(1)。次に、p97/p47 のゴルジ体膜上の受容体 syn5 を同定し(2)、さらに p97 経路の新規必須因子として脱ユビキチン化活性を示す VCIP135 を発見している(3)。申請者はその後、p97/p47 経路が、細胞分裂期における娘細胞での細胞内小器官の再構成に特化した膜融合機構である事を示した(4)。この発見を基にして、ゴルジ体・小胞体の細胞周期間期での維持に必須であるもう一つの新規膜融合機構 p97/p37 経路を発見している(5)。加えて最近には、ゴルジ体の再構成に働く p97/p47 膜融合経路のみで必要な新規 VCIP135 結合タンパク質である WAC を発見した(6)。同時に、p97 膜融合の諸因子の分子構造も次々と明らかにしている(7,8)。

以上のように我々は、二つの p97 膜融合経路とも共通して脱ユビキチン化活性を示す VCIP135 を必要とすることを明らかにしてきた。ところが、働く場所(小胞体とゴルジ体)も機能する時期(間期と分裂期)も異なることから、その VCIP135 の作用機序には大きな多様性があると考えられるものの、現在の所、脱ユビキチン化活性の基質も含めて全く不明である。加えて意外な事に、この程我々は、VCIP135 の脱ユビキチン化活性はゴルジ体の再構成に働く p97/p47 経路でのみ必要で、それ以外の p97 膜融合系では VCIP135 はユビキチン非依存的に機能していることを明らかにした(「研究計画」の図2参照)(5,6)。そこで本研究では、VCIP135 の脱ユビキチン化酵素としての働きに加えて、そのユビキチン非依存的な機能を解明することにより、小胞体・ゴルジ体の各々の形成維持に働く p97 膜融合系の作用機構の差異を明らかにすることを目的とする。

1. Kondo H, et al. p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion. *Nature*, 388: 75-78, 1997
2. Kondo H, et al. Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro. *Cell*, 92: 603-610, 1998
3. Uchiyama K, Kondo H (corresponding), et al. VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J Cell Biol*, 159: 855-866, 2002
4. Uchiyama K, Kondo H (corresponding author), et al. The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi disassembly-assembly during the cell cycle. *J Cell Biol*, 161: 1067-1079, 2004
5. Uchiyama K, Kondo H (corresponding author), et al. p37 is a novel p97 adaptor required for Golgi and ER maintenance during interphase. *Developmental Cell*, 11:803-816, 2007
6. Totsukawa G, Kondo H (corresponding author), et al. VCIP135 deubiquitinase and its binding protein, WAC, in p97ATPase-mediated membrane fusion. *EMBO J*, 30: 3581-3593, 2011
7. Beuron F, Kondo H, et al. Conformational changes in the AAA ATPase p97-p47 adaptor complex. *EMBO J*, 25:1967-1976, 2006.
8. Briggs LC, Kondo H, et al. Analysis of nucleotide binding to p97 reveals the properties of a tandem AAA hexameric ATPase. *J Biol Chem*, 283:13745-13752, 2008

## 2. 研究の目的

VCIP135 は、小胞体とゴルジ体の両方の膜融合に機能する p97 膜融合系の必須因子であるが、その作用にはユビキチン依存的と非依存的なものがあることを我々は明らかにしている(Dev Cell 2007; EMBO J 2011)。即ち、VCIP135 の脱ユビキチン化活性はゴルジ体膜の膜融合に働く p97/p47 経路においてのみ必要であり、その際には VCIP135 と結合してその脱ユビキチン化活性を促進する WAC も同時に必要であった(右の図2)。一方で、思いがけない事に、その他の p97 膜融合系(小胞体での両 p97 経路、ゴルジ体での p97/p37 経路)では、VCIP135 は必要であるものの、その脱ユビキチン化活性は必要でなく、VCIP135 はユビキチン非依存的に働くことが明らかとなった。

そこで本研究は、VCIP135 における「脱ユビキチン化酵素の機能」と「ユビキチン非依存的な機能」という相異なる二つの働きの分子機構を明らかにし、細胞内小器官形成に必

要な p97 膜融合系の作用機構を包括的に理解することを目的とする。そのために先ず VCIP135 の細胞周期による制御機構を検討した。加えて、ゴルジ体膜と小胞体膜から VCIP135 結合蛋白質を探索する。その蛋白質の機能としては、脱ユビキチン化活性を阻害しつつ、VCIP135 をユビキチン非依存的な方向に誘導することを想定している。

### 3. 研究の方法

#### A. VCIP135 の細胞分裂期におけるリン酸化

HeLa 培養細胞を、aphidicolin を用いて細胞分裂期に同調して、VCIP135 のリン酸化を調べた。リン酸化修飾の有無は、<sup>32</sup>P 標識されたオルトリン酸塩を培養液に加えて細胞培養を行なった。培養細胞中の VCIP135 は、変成条件下での抗 VCIP135 を用いた免疫沈降抗体法で単離して、それを SDS-PAGE で分離して、オートラジオグラフィーでリン酸化 VCIP135 を検出した。

#### B. VCIP135 のリン酸化部位の同定

各種 VCIP135 (変異体含む) を、Hela 細胞を同調して調製した細胞分裂期上清と共に <sup>32</sup>P-AYP 存在下でインキュベートした。その時に、各種キナーゼ阻害剤の効果も確かめた。

#### C. 試験管内ゴルジ体再構成系

ラット肝臓から高度に精製したゴルジ体膜に、HeLa 培養細胞の分裂期上清を加えて 37 度で 1 時間培養すると、試験管内でゴルジ体が小胞化する (細胞分裂期ゴルジ体小胞)。試験管内でこの細胞分裂期ゴルジ体小胞に、p97/p47 と共に、ないしは p97/p37/p115 と共に、VCIP135 (ないしはその変異体) を加えて、ゴルジ体膜の融合が起こってゴルジ体槽板の再形成が認められるかを電子顕微鏡で観察した。

### 4. 研究成果

#### A. VCIP135 の細胞分裂期におけるリン酸化

HeLa 培養細胞を、aphidicolin を用いて細胞分裂期に同調して、VCIP135 のリン酸化を調べた。細胞分裂期では、間期に比べて、VCIP135 のバンドが上にシフトしており、オートラジオグラフィーでもそのリン酸化が示されている。

次にそのリン酸化に関わるキナーゼを同定するために、各種キナーゼ阻害剤の効果を検討した。その結果、Staurosporine (broad serine/threonine kinase inhibitor) や olomoucine (Cdc2 inhibitor) が強い阻害効果を示し、Cdc2 がキナーゼ候補として考えられた。そこで、実際に精製 Cdc2 を VCIP135 に加えた所、VCIP135 のリン酸化が見られたので、細胞分裂期の VCIP135 のリン酸化は

Cdc2 によってなされていることが明らかとなった。

また、VCIP135 上のリン酸化部位を同定するために、先ずは VCIP135 を二つの fragment に分けて、どちらがリン酸化されているかを調べた。C 末 fragment (728-1221 アミノ酸) にリン酸化部位があった。その領域の Cdc2 によるリン酸化候補部位を調べた所、746 番目のセリン、760 番目のスレオニン、767 番目のセリン、997 番目のセリンの 4 カ所があったので、それぞれをリン酸化されないアラニンに置換した変異体を作成した。そのうち T760A と S767A においてリン酸化の減少が見られ、さらに T760A と S767A の両方の変異を同時に導入した変異体では全くリン酸化が見られなくなった。よって、VCIP135 の細胞分裂期リン酸化部位は 760 番目のスレオニンと 767 番目のセリンであることが分かった。

細胞分裂期に VCIP135 がリン酸化されることを見出したが、それがどのように VCIP135 の機能に影響を与えるかを調べることにした。VCIP135 は p97 に結合することを我々は以前に報告しているので、リン酸化がその結合に与える影響について先ず検討した。VCIP135 を Cdc2 でリン酸化した後に、GST-p97 との結合を調べた所、結合性が失われていた。Cdc2 によるリン酸化を阻害剤 olomoucine で阻害してやると、p97 との結合性は回復した。これを疑似リン酸化変異体 VCIP135(T760E, S767E) を用いて検討した所、疑似リン酸化変異体の p97 結合能も失われていた。

細胞分裂期の細胞上清では VCIP135 はリン酸化されているが、これが p97 と複合体を形成しているかどうかを実際に調べた。抗 VCIP135 抗体を用いて免疫沈降を行うと、間期の細胞質上清では VCIP135 と共に p97 も共沈してきたが、分裂期上清では共沈してきた p97 量が明らかに減少していた。以上をまとめると、細胞分裂期にリン酸化された VCIP135 は p97 に対する結合能を失っていることが明らかとなった。

一方で、VCIP135 は脱ユビキチン化活性を持っていることが報告されており、その脱ユビキチン化活性を促進する因子として我々は WAC を報告している。VCIP135 の分裂期におけるリン酸化が、これらにどのような影響を及ぼすかについても検討を加えた。Cdc2 によってリン酸化された VCIP135 や VCIP135 疑似リン酸化変異体は、コントロールと同じように WAC に結合した。また同じく、リン酸化 VCIP135 や VCIP135 疑似リン酸化変異体は、その脱ユビキチン化活性には全く変化を生じなかった。

以上から、細胞分裂期における VCIP135 のリン酸化修飾は、VCIP135 の p97 に対する結合能を減弱させるが、WAC 結合性や脱ユビキチン化活性には影響を与えないことが明らかとなった。

上記のように細胞分裂期に VCIP135 は 760 番目のスレオニンと 767 番目のセリンがリン

酸化されることを明らかにした。そこで次には、これらのリン酸化が、p97ATPase によるゴルジ体膜融合機構の必須因子である VCIP135 の機能に与える影響について、試験管内ゴルジ体再構成系を用いて検討した。

ラット肝臓から高度に精製したゴルジ体膜に、HeLa 培養細胞の分裂期上清を加えて 37 度で 1 時間培養すると、試験管内でゴルジ体が小胞化する（細胞分裂期ゴルジ体小胞）。試験管内でこの細胞分裂期ゴルジ体小胞に、p97/p47 と共に、ないしは p97/p37/p115 と共に、VCIP135wt を加えると、ゴルジ体膜の融合が起こってゴルジ体槽板の再形成が認められる。ところが、VCIP135wt の代わりに、擬似リン酸化変異体である VCIP135 (T760E, S767E) を加えた場合、p97/p47 でも p97/p37/p115 でもゴルジ体槽板の形成は大きく減弱していた。即ちこれから、VCIP135 の細胞分裂期特異的リン酸化修飾によって、p97/p47 経路と p97/p37 経路によるゴルジ体膜の融合は阻害されることが示された。

細胞分裂期にはゴルジ体は、その一部は小胞体に吸収され、それ以外の大部分は小胞化して細胞質全体に広がる。この細胞分裂期におけるゴルジ体の小胞化のためには、細胞内膜の融合機構が阻害されることが必要である。細胞分裂期におけるゴルジ体の再構成に必要な膜融合機構として NSF 経路と p97 経路がある。そのうちの NSF 経路は、膜係留複合体 p115-GM130 を必要とするが、p115 が分裂期特異的にリン酸化されて p115-GM130 複合体が解離することによって、分裂期特異的に膜融合能が停止することが報告されている。p97 経路の一つ、p97/p37 経路も、NSF 経路と同様に膜係留複合体 p115-GM130 を必要とすることから、p115 の分裂期特異的リン酸化によって、その膜融合機能が分裂期に停止すると考えられる。もう一つの p97/p47 経路では、p47 が分裂期特異的にリン酸化され、ゴルジ体への結合のが失われるのが分裂期停止の分子機構であることを我々は以前に報告している。今回我々が見いだした VCIP135 の分裂期特異的リン酸化による膜融合停止は、上記の p97 による膜融合の分裂期特異的な停止機構を更に厳重にコントロールする意味を持っていると考えられる。以上のように細胞分裂期における膜融合は何重にも厳密に制御されており、それによって分裂期のゴルジ体は小胞化することになる。言い換えれば、分裂期のゴルジ体の小胞化はそれほど重要なイベントであるとも言えるが、その意義についてはよく分かっていない。

#### B. VCIP135 の新規結合蛋白質 p31

VCIP135 の活性化因子である WAC の新規結合蛋白質を、Yeast two-hybrid 法を用いて検索した。その結果、p31 を単離同定することに成功した。興味深いことに、この p31 は WAC のみならず VCIP135 とともに直接に結合して、p31-WAC-VCIP135 の三者複合体を形成した。

さらに、p31 の細胞内局在はゴルジ体であり、その機能として Ub リガーゼであると考えられた。現在その機能について、更に検討を進めている。

#### 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. Mitotic Phosphorylation of VCIP135 blocks p97ATPase-mediated Golgimembrane fusion. *Biochem Biophys Res Commun*, 433: 237-242, 2013

2. 中野 優, 近藤 久雄, p97ATPase 膜融合機構によるゴルジ体・小胞体の形成維持特集 細胞の分子構造と機能 核以外の細胞小器官、生体の科学 63 巻, 5 号 (2012 年 10 月) pp. 394-395

[学会発表](計 2 件)

1. Kondo H 招待講演 「p97ATPase-mediated membrane fusion in Golgi biogenesis.」, 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」, 分子生物学会、2012 年 12 月

2. 金子弥生、十津川剛、近藤久雄 「p55 is a novel essential factor in p97ATPase-mediated Golgi membrane fusion」, 分子生物学会、2012 年 12 月

[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：  
出願年月日：  
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

近藤久雄 (KONDO Hisao)

九州大学大学院医学研究院・教授

研究者番号：20205561

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：