

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 2 月 16 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440092

研究課題名(和文) ゴルジ体に局在する5回膜貫通蛋白質群YIPFの機能解明

研究課題名(英文) The function of YIPFs, five-span transmembrane proteins localizing in the Golgi apparatus.

研究代表者

中村 暢宏 (NAKAMURA, Nobuhiro)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50294955

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)：Yip1p, Yif1pは、小胞体 - ゴルジ体間の小胞輸送に必須の複数回膜貫通タンパク質である。哺乳類では9種の水モログが存在するが、これらの機能はほとんど理解されていない。本研究では、局在や機能が未解析であるYIPF1, YIPF2及びYIPF6についてその局在と機能を解析した。免疫蛍光染色によってYIPF1, YIPF2及びYIPF6が主としてトランスゴルジ局在することが明らかとなった。また、薬剤や遺伝子発現抑制による実験から、YIPF1とYIPF2がゴルジ体の集合促進に働き、ムチン産生細胞での正常な糖鎖合成に重要な働きを持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Yip1p and Yif1p are multi-span trans-membrane proteins reported to function in the vesicular transport between the ER and the Golgi apparatus. Nine homologues were found in mammalian cells although the functions of those proteins remain largely unknown. Especially, the localization and the function of YIPF1, YIPF2 and YIPF6 have never been analyzed. Immunofluorescence analyses revealed that YIPF1, YIPF2 and YIPF6 localize in trans-Golgi. In addition, gene knockdown and drug treatment analyses showed that YIPF1 and YIPF2 support the assembly of the Golgi apparatus and facilitate the glycosylation in mucin secretory cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 小胞輸送 膜貫通タンパク質 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母の Yip1p, Yif1p は、小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送に必須の因子として同定された (Gallwitz ら, 1998, 2000)。Yip1p, Yif1p は、Rab/ Ypt GTPase と相互作用することから、輸送小胞の形成や標的膜との融合の調節に働くことが予想された。ちょうどその頃、私達はゴルジ体の膜タンパク質の局在化やゴルジ体の構造維持のカギとなる膜貫通タンパク質を探索していた。私達は Yip1p, Yif1p がこの役割を果たす絶好の候補タンパク質であると考へ Yip1, Yif1 のヒト相同遺伝子の解析を開始した。その結果、私達は Yip1 と Yif1 のホモログ遺伝子がヒトには9種類存在すること (表 1)、またこれらの遺伝子がヒトから高等植物に至るまでほとんど全ての真核生物に広く保存されていることを見いだした。また、これらのホモログ産物の全てが、N 末端を細胞質側、C 末端を膜内腔側に配向した5回膜貫通タンパク質であることを見いだした (Shakoori ら, Biochem Biophys Res Commun, 2003, 図 1)。

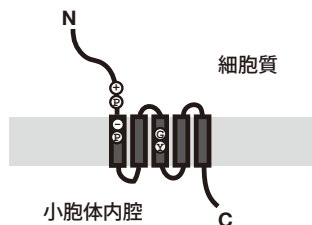


図1 YIPF の構造 YIPF は N 末端を細胞質側に、C 末端を膜内腔側に配向した5回膜貫通タンパク質である。ヒト YIPF ファミリー全てに保存されている残基を示した。+ は正電荷、- は負電荷を持った残基の保存を示す。

その後、Yip1p, Yif1p のホモログは、この5回膜貫通部分 (YIP ドメイン) を持つタンパク質群ということから、YIP ドメインファミリー (YIPF) と命名された (ちなみに、Yif1p オルソログは、我々の主張に反して酵母のオリジナル遺伝子名を用いて YIF1A, YIF1B と命名されている: 表 1)。ヒトでは、Yip1p, Yif1p のオルソログにはそれぞれ高い相同性を示す2つのアイソフォームが存在する (YIPF5 と YIPF7 [別名 YIP1A と YIP1B], YIF1A と YIF1B)。また、その他に Yip1p に2種 (YIPF4, YIPF6)、Yif1p に3種 (YIPF3, YIPF2, YIPF1) のパラログが存在する (表 1)。

表 1 ヒト YIPF の分類と局在

YIPF は Yip1p と Yif1p のそれぞれのホモログに分類される。Yip1p ホモログと Yif1p ホモログは表の各段で示す3種の組み合わせで複合体を形成し、それぞれの複合体が異なる分布を示す。YIPF5 と YIPF7 のように同じ欄に示したものは、80% 以上の相同性を示す。

Yip1pホモログ	Yif1pホモログ	局在
YIPF5[YIP1A]/YIPF7	YIF1A/YIF1B	ERGIC/cis-Golgi
YIPF4	YIPF3	cis-Golgi
YIPF6	YIPF1/YIPF2	trans-Golgi

出芽酵母の Yip1p と Yif1p が複合体を形成

することが報告されていたが、ヒト YIPF5 (Yip1p オルソログ) と YIF1A (Yif1p オルソログ) も複合体を形成することが明らかになった (Yoshida ら, Exp Cell Res, 2009, 表 1)。また、パラログである YIPF3 と YIPF4 も複合体を形成する事が明らかになった (Tanimoto ら, Cell Struct Func, 36: 171-185, 2011)。面白い事に、これら3種の複合体は互いに独立であって、表 1 にまとめたパートナーの間でのみ複合体を形成する。さらに、パートナー分子が複合体を形成することによってお互いの分子が安定化されることもわかった。それぞれの複合体が定常状態で局在する部位は、ERGIC (YIPF5, YIF1A), cis-Golgi (YIPF4, YIPF3) と異なっていた。また、YIPF5/YIF1A は小胞体とゴルジ体間を、YIPF4 と YIPF3 は ERGIC とゴルジ体をリサイクリングしていることも明らかとなった (Yoshida ら, Exp Cell Res, 2009, Tanimoto ら, Cell Struct Func, 36: 171-185, 2011)。また、本研究の開始直前までに、YIPF1, YIPF2 と YIPF6 もゴルジ体に局在し、複合体を形成することが明らかとなってきた。

驚いたことに、これまでのところ YIPF ファミリーのいずれかを個別に、あるいは全てを組み合わせてノックダウンしても培養細胞の生育には有意な影響が見られていない。この結果は、YIPF ファミリーが生育に必須の機能を果たしていないか、あるいは、残った YIPF (~10%程度) が相補し合って十分な機能を果たしていることを示唆している。しかし、(1)YIPF5, YIF1A, YIPF3, YIPF4 のノックダウンによって、ゴルジ体での膜融合が阻害されることや (Yoshida ら, Exp Cell Res, 2009), (2)YIF1A, YIF1B が COPI 輸送小胞形成を調節する ARFGAP1 と相互作用すること (Akhter, J Juzen Med Soc, 2007), (3)YIPF3 の過剰発現が、ゼブラフィッシュの正常な胚発生に必須な因子に輸送を阻害するらしいこと (未発表データ) から、YIPF が特定のリガンド (輸送タンパク質) と結合して、ゴルジ体での輸送小胞の形成とそこへのリガンドの積載を調節している可能性が強く示唆される。すなわち、YIPF ファミリーが特定の分化・分極した細胞で特定の分泌タンパク質や膜タンパク質の輸送を調節している可能性が考えられる。実際、YIPF6 の欠損によってムチンの分泌低下を引き起こされ、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性の大腸炎を改悪することが報告され、YIPF 免疫に関わる組織や臓器特異的な機能を担っている可能性が具体化してきた (Brandl, Proc Natl Acad Sci, 2012)。

2. 研究の目的

YIP ドメインファミリー (YIPF) は、ゴルジ体とゴルジ体と小胞体の中間区画 (ERGIC) に局在する5回膜貫通タンパク質群である。YIPF の元祖である酵母の2種の

タンパク質(Yip1p, Yif1p)は、小胞体-ゴルジ体間の輸送に必須であり、Rab/Ypt GTPaseと相互作用して小胞の形成や融合を調節することが示唆されている(Gallwitz ら, 1998, 2000)。YIPF はヒトから高等植物まで生物種を超えて広く保存されており、真核生物の生存に重要な役割を果たしていることが推察される(Shakoori ら, Biochem Biophys Res Commun, 2003)。しかしながら、脊椎動物のYIPFの生理的機能はほとんど理解されていない。そこで本研究では、培養細胞レベルおよびゼブラフィッシュを用いた個体レベルの解析によって、YIPFの生理的機能を明らかにすることを目的とした。特に最も解析が遅れていたYIPF1, YIPF2及びYIPF6にターゲットを絞って、まず、(1)その局在と動態を解析することを目的として実験を開始した。次に、(2)変異体の発現や、遺伝子発現抑制を用いて、形態学的・生化学的解析を行い、YIPF1, YIPF2, YIPF6間の複合体形成の意義を明らかにすることを目的として実験を行った。最後に、遺伝子発現抑制を用いて(3)YIPF1, YIPF2, YIPF6の機能を明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) YIPF1, YIPF2 及び YIPF6 の局在と動態の解析

①YIPF1, YIPF2, YIPF6 を特異的に認識する抗体を作成し免疫蛍光染色でその局在を解析した。②YIPF タンパク質群の間で最も保存性の高いアミノ酸残基をアラニンに変異させて細胞に導入し、その効果を解析した。

(2) YIPF1, YIPF2, YIPF6 間の複合体形成の意義の解析

①HeLa細胞にYIPF1, YIPF2, YIPF6を外来性に発現させ免疫蛍光染色法とウェスタン・ブロッティング法で発現効率を解析した。②YIPF1, YIPF2あるいはYIPF6を発現させた細胞をエポキシマイシン処理、あるいはバフィロマイシン A1 処理し、それぞれのタンパク質量をウェスタン・ブロッティング法で定量した。

(3) YIPF1, YIPF2, YIPF6 の機能解析

①HeLa細胞にsiRNAを導入してYIPF1, YIPF2及びYIPF6のノックダウンを行い、ウェスタン・ブロッティングによって各タンパク質量を定量するとともに、免疫蛍光染色によってゴルジ体の形態を観察した。②ノックダウン細胞をBrefeldinAで1時間処理しゴルジ体の分散を誘導した後、あるいはさらに薬剤を洗浄除去し1時間培養した後ゴルジ体の形態観察を行った。③HT-29細胞を用いて、YIPF1, YIPF2及びYIPF6のノックダウンを行い、PAS染色にて糖鎖含量を解析した。

4. 研究成果

(1) YIPF1, YIPF2 及び YIPF6 の局在と動態の解析

①YIPF1, YIPF2, YIPF6のいずれの抗体によっても典型的なゴルジ体染色像を得た。ゴルジ体のシスからトランスにかけてのマーカートンパク質と共染色して、それぞれの分布を詳細に解析したところ、YIPF1, YIPF2, YIPF6はシスゴルジには少なく、メディアルゴルジ以降に多く分布していることが明らかとなった。また、YIPF6はゴルジ体のメディアル部位からTGNにかけて広く分布していたが、YIPF1とYIPF2はトランスゴルジからTGNにかけてより多く分布していた。YIPF1及びYIPF2はさらにエンドソーム用の細胞質顆粒状構造にも局在していた。以上のことから、YIPF1, YIPF2, YIPF6は主としてトランスゴルジ局在することが明らかとなった(未発表データ)。

②YIPF タンパク質群の間で最も保存性の高いアミノ酸残基(N末端細質領域のR/K, 第1膜貫通部位の細胞質側境界のD, 第3膜貫通部位のGY: 図1参照)に注目して、これらの残基をAに変異させて細胞に導入し、その効果を解析した。低レベル発現細胞で変異体の局在を観察したところ、野生型との大きな違いは観察されなかった。特にR/K->Aの変異体はほとんど野生型と同じ局在を示した。また、野生型のYIPF1, YIPF2, YIPF6と同様に変異体の過剰発現によってゴルジ体の分散が観察された。一方、D->A, GY->AAの変異体は小胞体(ER)に蓄積する傾向を示した。また、YIPF2の野生型は中程度の発現レベルでエンドソーム用の構造に蓄積したが、YIPF2のD->A及びGY->AAの変異体はエンドソーム用の構造への蓄積を示さなかった。したがって、第1膜貫通部位の細胞質側境界のD, 第3膜貫通部位のGYがYIPFの局在に重要な役割を担っていることが示唆された(未発表データ)。

(2) YIPF1, YIPF2, YIPF6 間の複合体形成の意義の解析

①HeLa細胞にYIPF1, YIPF2とYIP6を外来性に発現させたところ、YIPF1とYIPF2は50%以上の細胞で高効率に発現したが、YIPF6は10%以下の細胞で低効率でしか発現しなかった。このことから、YIPF6のタンパク質量が翻訳以降で調節されている可能性が示唆された。また、YIPF1, YIPF2とYIPF6の複合体形成によってYIPF6の安定性が変化する可能性が考えられた。

②YIPF6は膜貫通タンパク質であり、複合体を形成する。多くの膜タンパク質複合体は小胞体内分解(ERAD)やリソソームでの分解によって調節されている。そこでまず、YIPF6がERADあるいはリソソームで分解されているかどうかを、阻害剤を用いた実験で確認した。YIPF6をトランスフェクションした細胞をEpoxyomicin処理、あるいはBafilomycin A1処理したところ、いずれの処理でもYIPF6の量が増加した(未発表データ)。したがって、過剰発現したYIPF6はERADで分解されるとともに、一部はリソソ

ームに輸送されて分解されることが明らかとなった。YIPF1についても同様に、両試薬それぞれでYIPF1の増加が観察され、過剰発現したYIPF1はERADで分解されるとともに、一部はリソソームに輸送されて分解されることが明らかとなった。しかしながら、YIPF2については、いずれの試薬でもタンパク質量の増加が見られなかったため、YIPF1、YIPF6と異なり安定であることが示唆された（未発表データ）。一方、内在性のYIPF1、YIPF2、YIPF6の量は、どちらの試薬によっても変化しなかった。したがって、内在性のYIPF1、YIPF2、YIPF6は安定であり、ERADやリソソームでの分解を受けていないことが明らかとなった。以上の結果から、YIPF6の発現量が低い理由として、ERADやリソソームでの分解が寄与していることが示唆された。しかしながら、YIPF1も同様の調節を受けているにもかかわらず、その発現量は高いことから、YIPF1と比べてYIPF6の翻訳量が少ないことが示唆された。YIPF6もYIPF1も同じベクターにより同じプロモーター下で発現させているため、YIPF6の発現がタンパク質翻訳レベルで抑制されている可能性が示唆された。複合体形成が直接翻訳効率を変化させる新奇な調節機構が存在する可能性が考えられる。

(3) YIPF1, YIPF2, YIPF6の機能解析

①HeLa細胞を用いてYIPF1、YIPF2及びYIPF6のノックダウンを行った。ウェスタン・ブロッティングによって各タンパク質を定量したところ、siRNA処理後72時間で、約10%と最大のタンパク質量の低下が観察された。同時点で免疫蛍光染色によってゴルジ体の形態を観察したところ、コントロールsiRNAと比較して有意な形態変化は観察されなかった。

②ノックダウン細胞をBrefeldin Aで1時間処理しゴルジ体の分散を誘導したところ、いずれのYIPFのノックダウンによってもコントロールとの差は観察されなかった。したがって、Brefeldin Aで処理によるゴルジ体の分散にはYIPF1、YIPF2、YIPF6は関与していないことが示唆された。面白いことに、Brefeldin Aで処理後、薬剤を洗浄除去し1時間培養したところ、コントロールの細胞ではゴルジ体がりボン状に再構築されたが、YIPF1及びYIPF2ノックダウン細胞では、りボン状への再構築が有意に阻害された（未発表データ）。YIPF6のノックダウンではこのような効果は観察されなかった。したがって、Brefeldin A処理後のゴルジ体の再構築においては、YIPF1及びYIPF2は促進的に働くことが示唆された。

③ムチンを産生するHT-29細胞を用いて、YIPF1、YIPF2及びYIPF6のノックダウンを行い、PAS染色にて糖鎖含有量を解析したところ、YIPF1あるいはYIPF2の発現抑制によって細胞内の糖タンパク質量が低下していることが明らかとなった。一方、YIPF6のノックダウンではこのような効果は見られな

った。以上のことから、YIPF1及びYIPF2は小胞体からゴルジ体への輸送とゴルジ体での糖鎖合成に促進的に働くことが示唆された（未発表データ）。

②と③の結果から、YIPF1及びYIPF2がゴルジ体の集合促進に働き、ムチン産生細胞での正常な糖鎖合成に重要な働きを持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Cervigni, R. I., Bonavita, R., Barretta, M. L., Spano, D., Ayala, I., Nakamura, N., Corda, D. & Colanzi, A. (2015). JNK2 controls fragmentation of the Golgi complex and the G2/M transition through phosphorylation of GRASP65. *J Cell Sci* 128, 2249-2260. (査読あり) 10.1242/jcs.164871
- (2) Ishida, R., Yamamoto, A., Nakayama, K., Sohda, M., Misumi, Y., Yasunaga, T. and Nakamura, N. (2015). GM130 is a parallel tetramer in a flexible rod-like structure with N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. *FEBS J.* 282, 2232-2244. (査読あり) 10.1111/febs.13271
- (3) Soonthornsit, J., Yamaguchi, Y., Tamura, D., Ishida, R., Nakakoji, Y., Osako, S., Yamamoto, A. and Nakamura, N. (2014). Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus. *Exp. Cell Res.* 328, 325-339. (査読あり) 10.1016/j.yexcr.2014.09.009

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Ryuichi Ishida, Nobuhiro Nakamura. GM130 is a parallel tetramer in a flexible rod-like structure with N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. "Molecular Membrane Biology", Gordon Research Conference, Proctor Academy, Andover, NH (USA) 2015. 7.12-17
- (2) Jeerawat Soonthornsit, Nobuhiro Nakamura. Low cytoplasmic pH reduced ER-Golgi transport and induces disassembly of the Golgi apparatus. 第66回日本細胞生物学会大会, 奈良県新公会堂, 東大寺総合文化センター (奈良県奈良市) 2014. 6. 11-13
- (3) 石田竜一, 安永卓生, 山本章嗣, 中山和久, 吉村信一郎, 原田彰宏, 中村暢宏. Rab1のGM130結合とその生理的意義. 第66回日本細胞生物学会大会, 奈良県新公会堂, 東大寺総合文化センター (奈良県

奈良市) 2014. 6. 11-13

- (4) 石田竜一, 中村暢宏. GM130 複合体の構造解析. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市) 2013. 12. 3-6
- (5) Yoko Yamaguchi, Daisuke Tamura, Jeerawat Soonthornsit, Ryuichi Ishida, and Nobuhiro Nakamura. Low cytoplasmic pH reduces ER-Golgi trafficking and induces disassembly of the Golgi apparatus in a phospholipase A2 dependent manner. Golgi Symposium 2013, Bad Ischl (Austria) 2013. 9. 17-19
- (6) Jeerawat Soonthornsit, Ryuichi Ishida, Nobuhiro Nakamura. Yipl domain family members localizing in the trans-Golgi/trans-Golgi network. 2013 "Molecular Membrane Biology" Gordon Research Conference, Proctor Academy, Andover, NH (USA) 2013. 7. 14-19

[その他]

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~osaru3/index-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 暢宏 (NAKAMURA, Nobuhiro)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号：50294955

(2)連携研究者

石田 竜一 (ISHIDA, Ryuichi)
京都産業大学・総合生命科学部・プロジェクト・ポストドクター
研究者番号：30611256