

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07353

研究課題名(和文) ゴルジ体形成に働くp97ATPase膜融合のユビキチン化による制御

研究課題名(英文) The control of p97-mediated Golgi membrane fusion and the ubiquitination

研究代表者

近藤 久雄 (Kondo, Hisao)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20205561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体は細胞内輸送の中心をなす細胞内小器官であり、その形成のためp97/p47膜融合が必要である。p97とp47によって形成された複合体は、脱ユビキチン化酵素VCIP135とその活性化因子WACと共に、ゴルジ体膜の融合を行う。本研究では、VCIP135の新規結合因子p42の単離同定に成功した。p42はVCIP135ならびにp97と複合体を形成し、細胞内局在はゴルジ体、小胞体とミトコンドリアであった。ゴルジ体膜を可溶化してp42抗体による免疫沈降を行った結果、このp42はアクチンと複合体を形成していた。さらに、p42発現を培養細胞で抑制するとゴルジ体が縮小するという興味深い表現型を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴルジ体は細胞内輸送の中心をなす細胞内小器官であり、細胞の機能に不可欠な重要な細胞内小器官である。ただ、そのゴルジ体の形成維持機構には不明な点が多い。結果として、発生・分化や様々な病態においてゴルジ体の構造・機能に大きな変化が生じるが、そのメカニズムも機能的意義もほとんど分かっていない状況である。従来までこのゴルジ体の形成維持には、微小管が重要であるというのが定説であった。ところが本研究において、新規因子p42を単離することにより、ゴルジ体形成とアクチンとが関連している可能性が強く示唆された。これは従来の定説を覆す可能性を強く示している。

研究成果の概要(英文)：The Golgi apparatus occupies a central position in the vesicle transport pathway. The Golgi biogenesis requires the p97/p47 membrane fusion pathway. p97 and p47 forms a complex and the complex induces Golgi membrane fusion in cooperation with VCIP135 and WAC, a deubiquitinating enzyme and its activator, respectively. In this project, we have succeeded in isolating a novel VCIP135-binding protein, p42. p42 forms a complex with VCIP135 and p97, and is localized to the Golgi and ER as well as mitochondria. Immunoprecipitation with anti-p42 antibodies showed that p42 was associated with actin in the Golgi. The deletion of p42 by siRNA caused the compressed Golgi, which is very similar to the Golgi morphology observed in the cells which is treated with cytochalasin D, a depolymerizing reagent.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体と小胞体は、共に細胞内蛋白質輸送に重要であるが、その形成維持の仕組みは大きく異なる。ゴルジ体は細胞分裂期に一旦小胞化して終期に娘細胞で再構成されるのに対して、小胞体は細胞分裂期でもその構造が保たれる。これら二つの小器官において共通して働く膜融合機構として p97ATPase 経路を申請者は発見しているが、その作用機序は細胞内小器官において幾つかの点で異なる。中でも、ゴルジ体のみにおいて細胞分裂期における再構成でユビキチン(Ub)化修飾が必要であり、ゴルジ体形成の特異性との強い関連性が示唆される。

我々は先に、p97ATPase によるゴルジ体形成に必須な脱 Ub 化酵素 VCIP135 に対して、活性化因子 Wac を発見している。

2. 研究の目的

p97ATPase による細胞内膜融合において、ユビキチン化修飾による制御機構を明らかにする。そのために、我々が発見した p97ATPase によるゴルジ体形成に必須な脱 Ub 化酵素 VCIP135 と、VCIP135 に結合して脱ユビキチン化活性を活性化する因子 Wac、これらの因子に対する結合タンパクを単離して、その機能を解析する。

3. 研究の方法、4. 研究成果

I. Wac に対する結合蛋白質の単離

我々は先に、p97ATPase によるゴルジ体形成に必須な脱 Ub 化酵素 VCIP135 に対して、活性化因子 Wac を発見している。本研究では、この Wac に対する新規結合因子を Yeast two-Hybrid 法で探索していた結果、新規因子 p27 を同定することに成功した。この p27 は、アミノ酸配列によるドメイン検索から、E3 ユビキチンリガーゼであることが予想されるものであったが、その機能についてはよく分かっていない。

さらに、そのリコンビナント蛋白質を大腸菌で発現・精製し、Wac との結合を試験管内で確かめたところ、直接に結合することが確かめられた。この Wac との複合体は全く新規のものであった。問題は、リコンビナント蛋白質を抗原としてウサギに注射し、抗体を作成を試みたが、なかなか良い抗体が得られないことである。この上は、ペプチド抗体作成かモノクローナル抗体作成に切り替える必要があるかと考えている。いったん抗体が得られれば、その細胞内局在はもとより、その機能についても検討するための重要なツールが得られることとなる。

II. VCIP135 に対する結合蛋白質の単離

VCIP135/wac 複合体に対する新規結合因子を探索している過程で、VCIP135 に特異的に結合する新規因子 (p42 と仮に命名) を同定することに成功した。ラット肝臓から調製したゴルジ体膜を 0.5% Tx100 を含むバッファーで可溶化し、抗 VCIP135 抗体を用いた免疫沈降を行った。その結果は、図 1 に示す。

この因子が実際に VCIP135 と結合するかどうかを生化学的な結合実験で確かめた。GST-p42, His-VCIP135, His-p97 は、リコンビナント蛋白質として大腸菌を用いて調製し、さらにショ糖密度勾配超遠心法やゲル濾過を用いて精製した。これらを用いて、試験管内で結合実験を行い、生じた複合体は GSH-beads で沈降させた。結果、p42 は VCIP135 に結合するのみならず、驚いたことに p97 にも直接に結合した。VCIP135 と p97 は VCIP135/p97 複合体を形成するが、この複合体にも p42 は結合した。

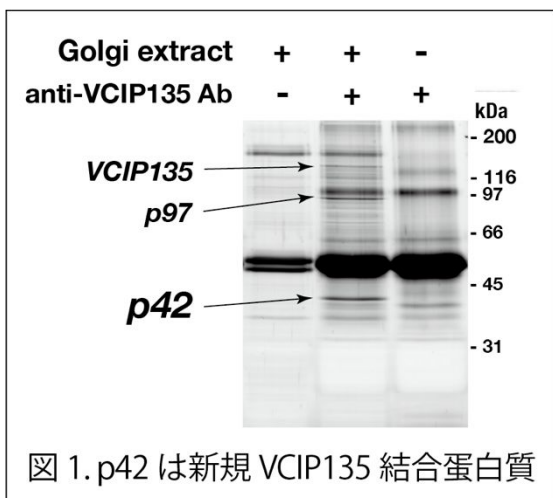


図 1. p42 は新規 VCIP135 結合蛋白質

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子弥生、近藤久雄
2. 発表標題 ゴルジ形成必須因子p55の機能解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金子弥生、近藤久雄
2. 発表標題 細胞分裂期のゴルジ体再構成に機能するp55
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中山鈴音、後藤侑奈、近藤久雄
2. 発表標題 p97 membrane fusion factors and actin fibers in the Golgi.
3. 学会等名 分子細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤侑奈、中山鈴音、近藤久雄
2. 発表標題 ゴルジ体膜融合因子VCIP135とアクチン線維網の関連
3. 学会等名 分子細胞生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----