

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07393

研究課題名(和文) ゴルジ体にはタネがある！？

研究課題名(英文) Finding the central core of the Golgi apparatus

研究代表者

中村 暢宏 (NAKAMURA, Nobuhiro)

京都産業大学・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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rab1がGM130の2カ所に結合しY字型とI字型の構造変化に関わる可能性が示唆された。Rab1によってGM130の会合状態や膜結合状態の調節が起こる可能性がある。DSGを用いた架橋実験により、YIPF1が26kDa、66kDa、YIPF2は22kDa、YIPF6は17kDaのタンパク質と結合していた。一過性発現させたYIPF6はリソソームでは分解されず、ERAD経路で顕著に分解されていた。動物界を含むホロゾア系統では6種のYIPFが保存して存在することが明らかとなった。ホロゾアではヒトYIPFと同様3種のYIPF複合体が存在し、ゴルジ体の上流、中流、下流に分極して存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初想定していたように、ゴルジ体の膜タンパク質とゴルジ体マトリックスタンパク質が相互作用し、ゴルジ体のタネ状構造を形成している可能性はさらに高まったと考えられる。残念ながら技術的な問題からゴルジ体のタネ状構造の存在を証明するには至らなかったが、本研究で得られた知見はゴルジ体の構造形成とタンパク質局在機構を解明するための基礎として大きな役割を果たすものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Rab1 was found to bind to the two distinct sites on GM130 and the Rab1 binding to GM130 was suggested to regulate the conformation of GM130 reading to the control of the higher-order assembly of GM130 and their association to the membrane. YIPF1 binds to proteins of 26kDa and 66kDa, YIPF2 binds to a 22kDa protein and YIPF6 binds to a 17kDa protein. Transiently expressed YIPF6 was found to be degraded by ERAD. YIPF proteins were found to be conserved in most of the eukaryotes and the 6 members of YIPF proteins were conserved widely in holozoa including animal cells. The analysis in human cells indicated that three distinct complexes are formed from two members of YIPF and localize in the upper, middle, and lower Golgi compartment. Therefore, in holozoa, YIPF proteins form complexes and differently localized at the Golgi apparatus.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ゴルジ体 膜タンパク質 タンパク質局在化 複合体形成

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体を取り巻く小胞輸送の分子機構は、小胞の形成と融合に働く COPI や SNARE などの発見によって、その詳細が明らかになっている。しかし、ゴルジ体へのタンパク質の局在化の分子機構には多くの謎が残されている。

膜貫通タンパク質のゴルジ体への局在には膜貫通部位が短いことが最も重要であり、膜内腔部位や細胞質部位でのタンパク質相互作用は補助的な役割を果たしていることが明らかになっている。この短い膜貫通部位がどのようにして認識され、ゴルジ体への局在を決めているかについては、タンパク質の相互作用によるとする仮説と、脂質との相互作用によるとする仮説の2つが提唱されている。しかし、どちらが適当であるのか現在のところ決着はついていない<sup>(1)</sup>。分泌タンパク質がゴルジ体の槽を入り口側(シス)から出口側(トランス)へと通り抜けるためには、槽がシス側からトランス側に向かってエスカレーターのように移動しつつ成熟することによって起こるとする説(槽成熟仮説)が有力である。一方、槽は移動せずに、分泌タンパク質が槽を行き交う輸送小胞で運ばれるとする説(小胞輸送仮説)も健在である。小胞輸送仮説の場合、ゴルジ体局在タンパク質はそれぞれの槽でタンパク質相互作用によって安定に局在していると考えれば良い。脂質との相互作用を考えた場合も、脂質の組成が槽ごとに安定に維持されると考えれば辻褃が合う。一方、槽成熟仮説の場合、成熟する槽からゴルジ体局在タンパク質を絶えずシス側に送らなければならない。ゴルジ体局在タンパク質を槽でのタンパク質相互作用を破って輸送小胞に積載しているはずだが、その機構は謎である。また、脂質との相互作用を考えた場合、成熟する槽の脂質組成をどのようにして維持しているのか、その機構も謎である。

ゴルジ体はシスとトランスに分極しているが、何がシスとトランスへのタンパク質局在の違いを決めるのかは理解されていない。小胞輸送仮説では、それぞれの槽に局在するタンパク質同士がお互いを認識しあってそれぞれの槽で安定に局在していれば良い。一方、槽成熟仮説では槽の成熟に伴ってシス側に局在するタンパク質のみが高効率で逆向輸送小胞に取り込まれ、逆にトランス側に局在するタンパク質は逆向輸送小胞に取り込まれないなどの機構を考えねばならない。小型 GTPase である Rab ファミリータンパク質 (Rab1, Rab2, Rab6) がシス・中間・トランス槽でゴルジ体タンパク質の輸送小胞への取り込みを調節している可能性があるが、確証は得られていない。ゴルジ槽の細胞質側表面にはゴルジ・マトリックスがある。ゴルジ・マトリックスは主として表在性膜タンパク質からなり、ゴルジ槽どうしの接着による層板形成や、Rab とともに小胞の融合を促進する「繫留」過程に関わると考えられている。ゴルジ・マトリックスも分極してゴルジ体に局在している。例えば、GM130 と GRASP65 はシス槽に局在するゴルジ・マトリックスであるが、槽の成熟に抗って局在を維持する分子機構は、これまた謎のままである。

細胞を Brefeldin A (BFA) で処理すると、ゴルジ体の中間槽やトランス槽に局在するタンパク質群のほとんどが逆向輸送によって小胞体に移行してしまう。一方、GM130 や syntaxin 5 などのシス槽に局在するタンパク質群は、BFA 処理によっても小胞体へは移行せず、細胞質に散在する小胞のクラスター「残余ゴルジ体」に残る。BFA を除去すると、小胞体から残余ゴルジ体に向かってゴルジ体タンパク質が移動し、さらに、中心体付近へ移動して元の層板構造を再形成する<sup>(2,3)</sup>。このことから、GM130 や syntaxin 5 などのシス槽に局在するタンパク質群の一部が「ゴルジ体のタネ」としてゴルジ体のタンパク質局在化の目印として働いている可能性が考えられる。特に、ゴルジ・マトリックスタンパク質である GM130 と GRASP65 は、共に細胞質側からゴルジ体の膜に結合している表在性膜タンパク質であり、1MDa の複合体を形成すること、細胞質で合成されて直接ゴルジ体へ局在化することから、真の「ゴルジ体のタネ」として、ゴルジ体のタンパク質を膜ごと繋ぎ止めている可能性がある<sup>(2-6)</sup>。

この細胞質の「ゴルジ体のタネ」は、ゴルジ体の膜貫通タンパク質を認識して結合するに違いない。そこで、私たちが目をつけたのが、ゴルジ体に局在する 5 回膜貫通タンパク質群 YIPF である。YIPF は小胞体とゴルジ体の中間区画 (ERGIC) 及びゴルジ体に局在する 5 回膜貫通タンパク質群であり、ヒトでは相同タンパク質が 9 種存在する<sup>(7-10)</sup>。YIPF は酵母の Yip1p・Yif1p の相同タンパク質であり、小胞体からゴルジ体への COPII 輸送小胞の形成、あるいは COPII 小胞のゴルジ体膜への融合に働くことが示唆されている。YIPF5-YIF1A は ERGIC/シス槽に局在し小胞体とゴルジ体の間を循環している。また、YIPF4-YIPF3 はシス槽に局在しゴルジ体の層板内でのみ循環している。さらに YIPF6-YIPF1/YIPF2 は中間/トランス槽に局在し中間/トランス槽とエンドソームの間を循環している。面白いことに、YIPF4-YIPF3 や YIPF6-YIPF1/YIPF2 は BFA 処理によって、小胞体へ移行することはない。このことから、YIPF も GM130-GRASP65 共に「ゴルジ体のタネ」として機能している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

前節に述べた我々の研究結果を踏まえ、本研究では GM130 の膜結合の分子機構を明らかにするとともに、YIPF タンパク質群との関係や動態を明らかにし、これらのタンパク質群が「ゴルジ体のタネ」として機能していることを証明し、これらのタンパク質群が他のゴルジ体のタンパク質を繋ぎ止めている可能性を検証することを試みた。具体的に次の 4 つの戦略から研究を進めた。(1) GM130 の構造変化と膜結合の調節機構を明らかにする一環として、GM130 と Rab1 タンパク質の結合部位の同定を行った。(2) GM130 の受容体あるいは受容体とアソシエイトしてゴルジ体のタネ構造を形成している可能性がある YIPF タンパク質群の結合因子の同定を行った。(3) YIPF タンパク質群の機能のため YIPF タンパク質の培養細胞での発現実験を行っていたところ、YIPF6 の発現が極端に少ないことを発見した。YIPF6 の発現量が ERAD で調節されている可能性を考え、その検証を行った。(4) YIPF タンパク質群の機能の手掛かりを得るために、YIPF 相同タンパク質の存在を現在データベースに登録されている全ての生物を対象として解析した。

## 3. 研究の方法

(1) GM130 の断片を各種作成し、活性型 Rab1 変異体 (GTP 加水分解能欠損)、非活性 Rab1 変異体 (GTP 結合不能) との相互作用を酵母ツーハイブリッド法にて解析した。(2) 化学架橋剤 DSG を用いて YIPF 結合タンパク質の同定を試みた。(3) HeLa 細胞にリポフェクション法によって YIPF6 を発現させた後、ERAD の阻害剤であるエポキシソマイシン、リソソーム阻害剤である場フィロマイシン等で処理し、YIPF6 の蓄積を解析した。(4) YIPF タンパク質群のアミノ酸配列をプローブとして用い、NCBI データベースに登録されている全ての生物のタンパク質アミノ酸配列(塩基から翻訳されたもの)から有意なホモロジーを示すものを網羅的にピックアップし、CLUSTAL X を用いてアライメントし、系統解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) GM130 と Rab1 との結合様式の解析

図 1 に示すように、GM130 の 110-215 および 690-770 の 2 カ所に結合することが明らかとなった。110-215 への結合は 690-770 より弱かった。GM130 は 4 量体であり、N 末端部分が 2 量体となって開いた Y 字型および閉じた I 字型の 2 つの構造を取ることが明らかになっていることから (11), Rab1 の 110-215 の結合が Y 字型と I 字型の構造変化に関わる可能性が示唆された。Rab1 によって GM130 の構造が変化することにより GM130 の会合状態や膜結合状態の調節が起こる可能性があることが明らかとなった (発表準備中)。

### (2) 化学架橋剤を用いて YIPF 結合タンパク質の同定

DSG で架橋処理を行った結果、抗 YIPF1 抗体でモノマーの YIPF1 以外に 67kDa, 107kDa のバンドが検出された (図 2, 矢印)。YIPF1 が 41kDa で検出されることから、これらのバンドはモノマーの YIPF1 と 26kDa, または 66kDa のタンパク質との架橋産物であることが推測される。モノマー-YIPF1 は 2.5mM 以上の濃度の DSG で処理した時に減少していた。一方、抗 YIPF2 抗体ではモノマーの YIPF2 以外に 64kDa のバンドが検出された。YIPF2 が 42kDa で検出され

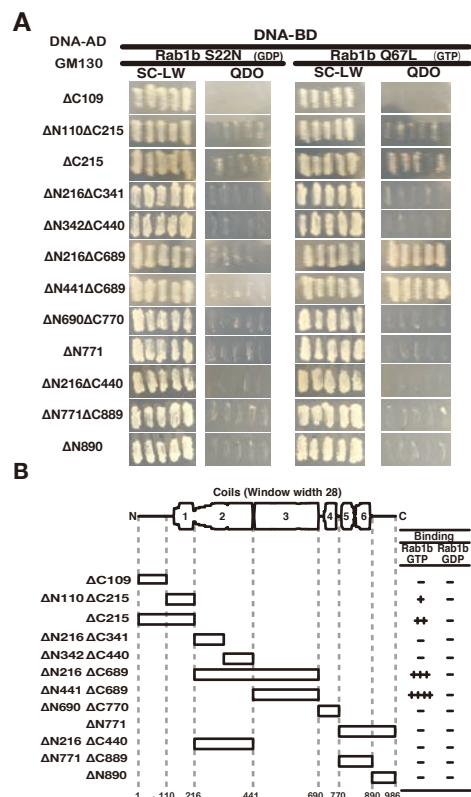


図 1 GM130 には Rab1 結合部位が 2 カ所ある各種 GM130 断片を作成し、酵母ツーハイブリッド法で Rab(GDP)、Rab(GTP) との結合を解析した。110-215 と 690-770 の 2 カ所で結合が見られた。

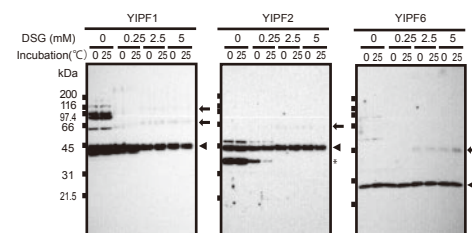


図 2 DSG による YIPF 結合タンパク質の検出 DSG を図に示した濃度で加え、室温または氷上で 2 時間インキュベートした後、細胞を超音波破砕し SDS-PAGE とそれぞれの YIPF タンパク質特異的抗体を用いてウェスタンブロッティングを行なった。



に分極して存在することが示唆された (図4) <sup>(12)</sup>。

以上の研究結果から、当初想定していたように、ゴルジ体の膜タンパク質とゴルジ体マトリックスタンパク質が相互作用し、ゴルジ体のタネ状構造を形成している可能性はさらに高まったと考えられる。残念ながら技術的な問題から研究期間内にゴルジ体のタネ状構造の存在を証明するには至らなかったが、本研究で得られた知見はゴルジ体の構造形成とタンパク質局在機構を解明するための基礎として大きな役割を果たすものと思われる。

<引用文献>

1. 中村暢宏. (2016). 分泌経路と小胞輸送発見の歴史 : メンブレントラフィック 2-18 (化学同人)
2. Nakamura, N. (2010). Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci* 112(3), 255-264.
3. Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T., Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 131, 1715-1726.
4. 中村暢宏., 吉村真一郎. (2004). ゴルジ体の”タネ”蛋白質 核酸 酵素 49, 920-921.
5. Yoshimura, S., Yamamoto, A., Misumi, Y., Sohda, M., Barr, F., Fujii, G., Shakoori, A., Ohno, H., Mihara, K., Nakamura, N. (2004). Dynamics of Golgi matrix proteins after the blockage of ER to Golgi transport. *J Biochem* 135, 201-216.
6. 中村暢宏., 吉村真一郎., 申恵姫, 中山和久. (2003). 小胞の選択性と小胞繫留機構 実験医学 21, 1947-1953.
7. Shakoori, A., Fujii, G., Yoshimura, S., Kitamura, M., Nakayama, K., Ito, T., Ohno, H., Nakamura, N. (2003). Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER *Biochem Biophys Res Commun* 312, 850-857.
8. Yoshida, Y., Suzuki, K., Yamamoto, A., Sakai, N., Bando, M., Tanimoto, K., Yamaguchi, Y., Sakaguchi, T., Akhter, H., Fujii, G., Yoshimura, S., Ogata, S., Sohda, M., Misumi, Y., Nakamura, N. (2008). YIPF5 and YIF1A recycle between the ER and the Golgi apparatus and are involved in the maintenance of the Golgi structure. *Exp Cell Res* 314, 3427-3443.
9. Tanimoto, K., Suzuki, K., Jokitalo, E., Sakai, N., Sakaguchi, T., Tamura, D., Fujii, G., Aoki, K., Takada, S., Ishida, R., Tanabe, M., Itoh, H., Yoneda, Y., Sohda, M., Misumi, Y., Nakamura, N. (2011). Characterization of YIPF3 and YIPF4, cis-Golgi Localizing Yip domain family proteins. *Cell Struct Funct* 36, 171-185.
10. Soonthornsit, J., Sakai, N., Sasaki, Y., Watanabe, R., Osako, S., Nakamura, N. (2017). YIPF1, YIPF2, and YIPF6 are medial-/trans-Golgi and trans-Golgi network-localized Yip domain family proteins, which play a role in the Golgi reassembly and glycan synthesis. *Exp Cell Res* 353, 100-108.
11. Ishida, R., Yamamoto, A., Nakayama, K., Sohda, M., Misumi, Y., Yasunaga, T., Nakamura, N. (2015). GM130 is a parallel tetramer with a flexible rod-like structure and N-terminally open (Y-shaped) and closed (I-shaped) conformations. *FEBS J* 282, 2232-2244.
12. Shaik, S., Pandey, H., Thirumalasetti, S., Nakamura, N. (2019). Characteristics and Functions of the Yip1 Domain Family (YIPF), Multi-Span Transmembrane Proteins Mainly Localized to the Golgi Apparatus. *Front Cell Dev Biol* 7, 130.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Soonthornsit Jeerawat, Sakai Noriko, Sasaki Yurika, Watanabe Ryota, Osako Shiho, Nakamura Nobuhiro	4. 巻 353
2. 論文標題 YIPF1, YIPF2, and YIPF6 are medial -/ trans -Golgi and trans -Golgi network-localized Yip domain family proteins, which play a role in the Golgi reassembly and glycan synthesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 100 ~ 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2017.03.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中村 暢宏	4. 巻 90
2. 論文標題 ゴルジ体病とゴルジ体の新機能	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 21 ~ 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900021	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shaheena Shaik, Himani Pandey, Satish Kumar Thirumalasetti, Nobuhiro Nakamura	4. 巻 7
2. 論文標題 Characteristics and Functions of the Yip1 Domain Family (YIPF), Multi-Span Transmembrane Proteins Mainly Localized to the Golgi Apparatus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2019.00130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shaheena Shaik, Shiho Osako, Shusuke Ijiri, Soonthornsit Jeerawat, Nobuhiro Nakamura
2. 発表標題 Regulation of the expression and function of YIPF proteins at the Golgi apparatus
3. 学会等名 第70回 日本細胞生物学会 第51回 日本発生生物学会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shaheena Shaik, Shiho Osako, Shusuke Ijiri, Soonthornsit Jeerawat, Nobuhiro Nakamura
2. 発表標題 Knockdown of YIPF1, YIPF2 caused delay in the Golgi to PM transport
3. 学会等名 The GOLGI Meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 暢宏
2. 発表標題 ゴルジ体にはタネがある？
3. 学会等名 第72 回日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

発生細胞生物学研究室 <a href="http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~osaru3/index-j.html">http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~osaru3/index-j.html</a>
---

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