

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19370088
 研究課題名 (和文) 細胞内小器官ゴルジ体・小胞体の形成維持のための分子機構
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism of Golgi and ER biogenesis
 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

研究成果の概要：

我々が 1997 年に発見した細胞内膜融合機構 p97/p47 経路に加えて、この程新規膜融合機構 p97/p37 経路を発見することが出来た。その新規の膜融合経路を解析し p97/p47 経路と比較検討した。その過程で、p97/p47 経路に特異的に働くゴルジ体形成新規必須因子 p87 を発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2008 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

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：ゴルジ体・小胞体。膜融合

1. 研究開始当初の背景

細胞内において、小胞体は mRNA から蛋白質の作られる場であり、生成蛋白質の品質管理の拠点でもある。その機能阻害は小胞体ストレスを引き起こす。小胞体で作られた蛋白質はゴルジ体に送られ、そこで修飾・選別さ

れた後に種々の目的地へ送り出されている。以上のように、小胞体・ゴルジ体は、まさに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。これら細胞内小器官の特徴的な構造は酵母から哺乳類まで幅広く見られること

から、これらの複雑な構造はその機能と密接に結びついていると考えられる。しかしながら、それら細胞内小器官の形成・維持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がどのように形成され、そしてそれらの構造がどのようにそれら特徴的な機能と結びついているのかという問題を明らかにするべく、p97ATPaseによる膜融合機構の解明を通して現在まで研究を行ってきた。p97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。以下、その概略につき簡単に説明する。

申請者は1997年にp97ATPaseの最初の補因子として新規蛋白質p47を発見したが、これがゴルジ体・小胞体の形成に必須の細胞内膜融合機構p97/p47経路の始まりである。次に、試験管内ゴルジ体再構成系を用いて、p97/p47の細胞内膜上の最初の受容体syntaxin5を世界に先駆けて発見し、膜融合複合体p97/p47はp47を介してsyn5と直接結合することを示した。申請者は英国ケンブリッジ大学にて独立後、p97経路の必須因子として新規蛋白質VCIP135を発見し、そのcDNAをクローニングした。VCIP135は、ATP依存的にp97/p47/syntaxin5複合体を解離するが、同時に脱ユビキチン酵素としても働く。さらにこの程に、申請者は日本に帰国後の最初の仕事として、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、ゴルジ体・小胞体の細胞周期間期での維持に必須の新規の膜融合機構p97/p37経路を発見している。

2. 研究の目的

本研究では、我々が発見したp97ATPaseによる二つの膜融合経路、p97/p47経路とp97/p37経路を比較検討して、p97ATPaseによる細胞内小器官形成・維持の分子機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法、並びに4. 研究成果

我々が1997年に発見した細胞内膜融合機構p97/p47経路に加えて、この程に新規膜融合機構p97/p37経路を発見することが出来た。試験管内ゴルジ体再構成系を用いてp37の機能を検討した結果、p37単独では膜融合能を呈せず、p97/p37複合体を形成すると膜融合を引き起こすことが分かった。この新規膜融合経路の分子機構は、p97/p47経路とは幾つかの重要な点で異なっていた。例えば、受容体としてsyntaxin5ではなくてGS15を必要とし、同時に小胞繫留装置p115-GM130複合体を必要とする。

このp97ATPaseによる異なる二つの膜融合経路の分子機構を解明するために、VCIP135の結合蛋白質を探索した。その結果、分子量87kDaの新規蛋白質を同定することが出来たので、それをp87と命名した。p87は、p97存在下でVCIP135と強く結合し、VCIP135/p97/p87の三者複合体を形成する。

VCIP135は脱ユビキチン化活性を示すので、p87の結合によるその脱ユビキチン化活性に対する影響を検討した。VCIP135単独での脱ユビキチン化活性は大変に低いですが、p87が結合することにより活性がやや上昇し、さらにVCIP135/p87/p97の三者複合体を形成することによりVCIP135の脱ユビキチン化は強く活性化される。

p87の細胞内局在を検討したところ、ゴルジ体に局在していた。また、siRNA法でp87の発現を抑制すると、ゴルジ体の扁平膜積層構造が失われた。同時に、試験管内におけるゴルジ体再構成系を用いてp87の機能を検討した。その結果、p87はp97/p47経路によるゴルジ体の再構成に必須の蛋白質であることが分かった。p97ATPaseによるもう一つの細胞内膜融合機構、p97/p37経路ではp87は機能していない事も明らかとなった。

p97/p47経路はゴルジ体の形成のみならず、小胞体の形成維持に必須である。そこで、p87の小胞体形成への関与についても検討した。ここで、最近に我々が開発した試験管内における小胞体再構成系を用いた。p97/p47経路は小胞体の形成に働き、その際にはVCIP135を必要とするが、p87は必要ではなかった。もう一つのp97経路であるp97/p37経路も、試験管内における小胞体再構成系で機能していたが、その時にもp97/p47経路と同様に、VCIP135は必要なもののp87は必要でなかった。

以上から、VCIP135の脱ユビキチン化活性に必要なp87が、小胞体の形成維持では必要ないということが明らかとなった。従って、それから考えられるのは、VCIP135の脱ユビキチン化活性は小胞体の形成に必要なのではないかという仮説である。そこで、試験管内における小胞体再構成系を用いてその仮説を検証した。脱ユビキチン化活性を持たないようアミノ酸変異させたVCIP135、即ち、VCIP135(C218S)とVCIP135(C218A)が、試験管内再構成系で機能するかどうか検討したところ、p97/p47経路とp97/p37経路の両方で野生型VCIP135と同様に機能した。以上から、小胞体の形成に必要なp97膜融合機構において、VCIP135は必要であるが、その脱ユビキチン化活性は必要ないことが明らか

となった。言い換えれば、ゴルジ体の細胞分裂期での再構成のみで、p97膜融合機構はVCIP135の脱ユビキチン化活性を必要とすることになる。このことは、ゴルジ体の細胞分裂期における再構成の特殊性を強く示唆する。

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3件)

Briggs LC, Baldwin GS, Miyata N, Kondo H, Zhang X, Freemont PS., ANALYSIS OF NUCLEOTIDE BINDING TO P97 REVEALS THE PROPERTIES OF A TANDEM AAA HEXAMERIC ATPASE, J Biol Chem, 283, 13745-52, 2009, 査読有り

Yamashiro S, Yamakita Y, Totsukawa G, Goto H, Kaibuchi K, Ito M, Hartshorne DJ, and Matsumura F. Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. Developmental Cell, 14 787-797, 2008 (査読有り)
藤瀬有岐子・土津川剛・近藤久雄、p97ATPaseによる細胞内小器官ゴルジ体・小胞体・核膜の形成維持機構、生化学、80、632-637、2008

[学会発表](計5件)

Kondo H.. Invited speech: p97ATPase-mediated biogenesis of the Golgi and ER. Symposium 'Organelle assembly and dysfunction'. 第59回日本細胞生物学会・第40回日本発生生物学会 合同大会、2007年5月29日

近藤久雄 シンポジウム「オルガネラバ イオロジーの最前線」にてタイトル「ゴルジ体・小胞体形成に関する最近の知見～特にp97ATPaseによる膜融合の観点から」、第71回日本生化学会中部支部会、2007年5月19日

近藤久雄 ワークショップ「ゴルジ体・小胞体の形成と維持のための分子機構を探る」、第4回可視化技術ワークショップ、2007年11月10日

近藤久雄 「p97ATPase による細胞内膜融合とユビキチン」、ワークショップ「膜輸送をめぐるユビキチン機能の新展開」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007 年 12 月 15 日

近藤久雄 「p97-mediated biogenesis of the Golgi and ER」、シンポジウム「オルガネラダイナミクスー形成・分解と機能制御」、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日

〔その他〕
ホームページ等

http://web.mac.com/hk228_01/iWeb/Site/Kondo-Lab.html

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

なし

(3) 連携研究者

十津川 剛 (TOTSUKAWA GO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：90399684