

平成21年5月18日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19770186
研究課題名（和文）VCIP135によるゴルジ体形態形成の分子機構の解明

研究課題名（英文）Role of VCIP135 in Golgi biogenesis

研究代表者 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

研究成果の概要：

ゴルジ体は、新たに合成されたタンパク質の修飾、選別、輸送の中心的な役割を担う細胞内小器官である。ゴルジ体の形態は扁平膜積層構造という非常に特徴的な構造であり、その高次構造がゴルジ体の機能と密接に関連していると考えられている。本研究で新規ゴルジ体形態形成必須因子、p87を同定することに成功した。ゴルジ体形態形成において、p87-VCIP135を介したユビキチンシグナルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	0	2,800,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	180,000	3,580,000

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：細胞構造・機能

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体は、新たに合成されたタンパク質の修飾、選別、輸送の中心的な役割を担う細胞内小器官（オルガネラ）である。ゴルジ体の形態は扁平膜が積層した非常に特徴的な構造を示し、その高次構

造がゴルジ体の機能と密接に関連していると考えられている。オルガネラがどのように構築され、維持されているかを明らかにする事は、オルガネラの機能を知る上で必要不可欠な事である。しかしながら、ゴルジ体形態形成における分子機

構については多くが不明であり、いくつかの仮説が提唱されてはいるが未だに定説を見ない。

我々の研究グループでは、細胞分裂期におけるゴルジ体再構成において、p97 ATPase/p47 を介した膜融合経路がゴルジ体形成に必須であることを明らかにしてきた。近年、新規タンパク質 VCIP135 を同定し、VCIP135 が p97/p47 によるゴルジ体再構成の必須因子として機能することを見出した。興味深いことに、VCIP135 が脱ユビキチン酵素であり、この脱ユビキチン活性がゴルジ体再構成に必須であることが明らかとなった。これらのことは、ゴルジ体再構成において、ユビキチンシグナルが非常に重要な役割を果たしている事を強く示唆するものである。VCIP135 を介したユビキチンシグナル伝達経路を解明する事は、扁平膜積層構造という非常に特徴的なゴルジ体形態形成の解明につながるだけでなく、ゴルジ体の動態とその機能との関連を分子レベルで考察する事に寄与するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、VCIP135 の脱ユビキチン活性の制御機構を明らかにすることにより、ゴルジ体形態形成の分子機構の解明を目的とした。上述のように VCIP135 はゴルジ体形成に必須なタンパク質であり、その脱ユビキチン活性も同様に必須である事が明らかとなった。そこで、

(1) VCIP135 の脱ユビキチン活性の活性制御機構の解明、をおこなった。VCIP135 の酵素活性は、時間的、空間的に厳密に制御されなければならない、また、基質も特異的に認識しなければならない

い。これらの制御機構を明らかにすることが大変重要であると考え。さらに
(2) ゴルジ体再構成における VCIP135 のターゲットとなる基質の同定、を行う。VCIP135 に認識されて脱ユビキチン化されるタンパク質は、ゴルジ体再構成において非常に重要な役割を果たすことが予想される。以上の結果から、ゴルジ体形態形成におけるユビキチンシグナル伝達経路の分子機構が明らかとなると考えられる。

3. 研究の方法

(1)VCIP135 結合タンパク質 p87 の同定
yeast two hybrid 法を用いて VCIP135 に結合活性を示すクローンを探索し、p87 を同定した。この p87 の GST-fusion protein を作成し、pull-down assay により VCIP135 結合活性を確認した。抗 p87 抗体を作成し、免疫沈降法を用いて、p87 と VCIP135 の結合を検討した。また、poly-ubiquitin chain を基質に用いて VCIP135 の脱ユビキチン活性に対する影響を検討した。

(2)p87 の機能

抗 p87 抗体を用いた間接蛍光抗体法により、p87 の細胞内局在を確認した。また、p87 に対する siRNA を作成し、RNAi 法によるノックダウンをおこなった。細胞を電子顕微鏡により観察し、ゴルジ体の微細構造を詳細に検討した。

4. 研究成果

新規 VCIP135 結合タンパク質の探索をおこない、新規タンパク質、p87 を同定することに成功した。p87 は rat において、調べたすべての組織で発現して

いることを確認した。p87のGST-fusion proteinを用いたpull-down assayにより、p87が直接

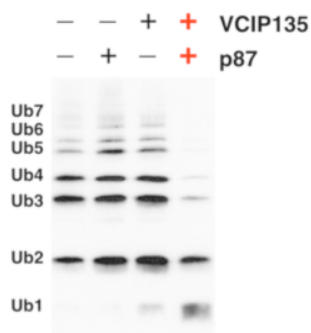


図1、VCIP135の脱ユビキチン活性

VCIP135に結合することを示した。また、抗p87抗体を用いた免疫沈降により、p87とVCIP135が複合体を形成していることを示した。そのp87の機能を検討したところ、p87がVCIP135の脱ユビキチン酵素活性を活性化させる、という非常に興味深い結果を得た(図1)。

また、免疫染色法を用いて、p87がゴルジ体に主に局在することを明らかにした(図2)。さらに、RNAi法によるp87をノックアウトした実験を用いて、p87のin vivoにおける機能を検討した。p87をノックアウトすると、ゴルジ体の扁平膜積層構造が崩壊し、ゴルジ体が断片化することを明らかにした(図3)。このことはp87がゴルジ体形態形成に必須因子として働いていることを示す。

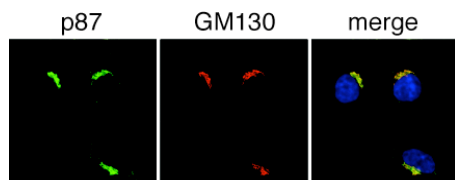


図2、p87の細胞内局在

これらの結果から、新規に同定したVCIP135結合タンパク質、p87がゴルジ体形成必須因子であることが明らかになった。VCIP135はゴルジ体形成必須因

子であり、その脱ユビキチン活性もゴルジ体形成に必須である。p87がVCIP135の脱ユビキチン活性を活性化することから、VCIP135-p87を介したユビキチンシグナルがゴルジ体形成に重要な役割を果たしていることが示された。現在、VCIP135およびp87によるゴルジ体形成における役割をさらに詳細に検討している。

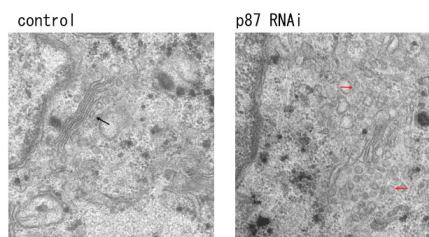


図3、p87のRNAiによるゴルジ体の形態

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)

1、Yamashiro, S., Y. Yamakita, G. Totsukawa, H. Goto, K. Kaibuchi, M. Ito, D.J. Hartshorne, and F. Matsumura. 2008. Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev Cell*. 14:787-97. 査読有

2、藤瀬 有希子、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(7) 632-637 (2008) 査読無

3、近藤 久雄、内山 圭司、土津川 剛、細胞内小器官の形成維持のための新たな分子機構、実験医学、25、848-851(2007) 査読無

[学会発表] (計3件)

1、近藤久雄、土津川剛、松浦-時田久美、「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・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月9日、神戸ポートアイランド

2、十津川剛、三宅善嗣、宮田暖、金子弥生、近藤久雄 「p97 ATPase 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、パシフィコ横浜

3、近藤久雄、十津川剛、金子弥生、小川洋子 「p97 ATPase によるゴルジ体・小胞体の形成維持機構」、シンポジウム「Organelle assembly and dysfunction」、第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、2007年5月29日、福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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