

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570114

研究課題名（和文）ゴルジ体局在タンパク質 golgin とゴルジ体構築機構

研究課題名（英文）Golgi structure and golgins

研究代表者

三角 佳生 (MISUMI YOSHIO)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：10148877

研究成果の概要（和文）：ゴルジ体は極性をもつ層板構造とその周りにある小胞やチューブ構造から成り立っている。この構造はさまざまなゴルジ体の機能を反映するものであり、膜のダイナミックな出入りの中で保たれている。本研究ではゴルジ体細胞質側局在コイルタンパク質である golgin-84 と複合型ゴルジ体局在タンパク質 COG 複合体の相互作用がどのようにゴルジ体構造維持に関与しているか解析した。その結果、ゴルジ体層板間逆輸送において小胞を繫留する機構に golgin-84 と COG 複合体が共役して働くことが明らかになった。また golgin-84 の共役因子として同定されている CASP は golgin-84 と COG 複合体の結合後に golgin-84 との相互作用を示すことが示唆された。これらの結果から golgin-84 は小胞輸送因子として働くことでゴルジ体の構造、機能維持に働くことが示された。

研究成果の概要（英文）：The coiled-coil Golgi membrane protein golgin-84 functions as a tethering factor for COPI vesicles. Protein interaction analyses have revealed that golgin-84 interacts with another tether, the conserved oligomeric Golgi (COG) complex, through its subunit Cog7. Therefore, we explored the function of golgin-84 as the tether for COPI vesicles of intra-Golgi retrograde traffic. First, glycosylation maturation of both plasma membrane (CD44) and lysosomal (lamp1) glycoproteins was distorted in golgin-84 knockdown (KD) cells. The depletion of golgin-84 caused fragmentation of the Golgi with the mislocalization of Golgi resident proteins, resulting in the accumulation of vesicles carrying intra-Golgi soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) and *cis*-Golgi membrane protein GPP130. Similar observations were obtained by diminution of the COG complex, suggesting a strong correlation between the two tethers. Indeed, COG complex-dependent (CCD) vesicles that accumulate in Cog3 or Cog7 KD cells carried golgin-84. Surprisingly, the interaction between golgin-84 and another candidate tethering partner CASP (CDP/cut alternatively spliced product) decreased in Cog3 KD cells. These results indicate that golgin-84 on COPI vesicles interact with the COG complex before SNARE assembly, suggesting that the interaction of golgin-84 with COG plays an important role in the tethering process of intra-Golgi retrograde vesicle traffic.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：細胞小器官、ゴルジ体、小胞輸送、golgin、局在化

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体の機能の支えとなる特異的な構造の構築機構を解析することは、その機能の理解に必須である。本研究は我々が解析を進めてきた golgin タンパク質がどのように相互作用しながらゴルジ体の形を作り上げているかを解析する。

ゴルジ体は数枚の扁平なゴルジ囊が積み重なったゴルジ層板とその近縁にある小胞から成り、シス（小胞体側）とトランス（形質膜側）という機能的な方向性をもつ細胞小器官である。細胞内小胞輸送の中心であるゴルジ体は物質の移送、選別、修飾をおこなっているが、これらのゴルジ体の機能と独特の形態は絶え間の無い小胞の受取、放出によって支えられている。近年、コレステロール合成酵素の転写調節因子がゴルジ体で活性化されることが明らかになり、さらにアポトーシス関連タンパク質 caspase2 がゴルジ体に存在することや低分子量 G タンパク質 Ras へのパルミチン酸の付加酵素のゴルジ体局在が示された。また神経細胞の分化過程においてゴルジ体局在タンパク質 GCP60 がシグナル伝達タンパク質の作用調節因子として働くことが明らかになっている (Zhou et al. Cell 129,163 2007)。これらの結果はゴルジ体がさまざまなシグナル伝達の調節点としての機能を持つことを示す。以上の観点から、ダイナミックな膜の移動のなかで、ゴルジ体がどのようにその形態とそれに伴う機能を維持しているかを知ることは、細胞の機能調節と細胞内シグナル伝達の理解に必須である。

ゴルジ体の構造維持機構に関するタンパク質の研究は、自己免疫疾患の患者血清や、ゴルジ体を認識するモノクローナル抗体を用いて多数のゴルジ体に局在する新規タンパク質が発見される事で大きく進んだ。これらのタンパク質の多くはゴルジ体細胞質側に大きな coiled-coil ドメインを持つタンパク質であった。多くの研究者がそれぞれ名前を付けて発表していて、M.J.Fritzler の golgin、我々の GCP、

F.Barr による GRASP、さらに p230、p210、p115 など現在まで 17 種のタンパク質が知られている。近年、これらのタンパク質を総称して golgin とよぶようになった。我々はこれまでゴルジ体の細胞質側に局在するタンパク質に焦点を当て、新規タンパク質 GCP364(giantin),GCP230, GCP170(golgin-160),GCP112(GM130), GCP60,GCP16 の存在を明らかにしてきた。Ras パルミトイルトランスフェラーゼの共役因子であり小さな分子の GCP16 以外の GCP は golgin タンパク質である。

golgin タンパク質はゴルジ体の層板や周辺の小胞の細胞質側に局在しているが、その多くはタンパク質相互作用及び脂質を介してゴルジ体膜に結合していて疎水性の膜結合領域をもっていない。現在までに giantin,golgin-84,CASP と golgin-67 の 4 種類の golgin が膜結合領域を持つことが明らかになっている。golgin タンパク質はその多くが小胞を標的膜へ繫留する繫留タンパク質として働くと考えられている。繫留とは小胞融合過程で比較的離れた距離にある小胞を特異的に引き寄せ、融合過程に導くきっけを作る過程であり、ゴルジ体の構造と機能を維持していく小胞輸送の調節を担っている過程の 1 つである。多数の golgin タンパク質がゴルジ体を取り巻く小胞輸送に関わっているが、それぞれの作用点や相互作用は明らかになっていない。

2. 研究の目的

これらの golgin タンパク質はお互いにどのような役割分担で小胞の繫留に関与しているのだろうか？ G.Warren らによる *in vitro* のゴルジ体再構築系を用いた一連の実験により、golgin ファミリーである giantin,GM130 と p115 は共役して COPI コート小胞の繫留に働くと考えられている。我々は p115 欠損細胞においては小胞体からゴルジ体への輸送に働く小胞の減少が観察され、giantin を含む COPI

小胞の増加または減少はみられない事を明らかにした(Sohda et al. **BBRC** 2005)。これらの結果は Warren らの報告に反して、giantin が COPI コート小胞の繫留に p115 と共役する可能性が低いことを示唆する。一方、golgin ファミリータンパク質の多くはその作用過程において、低分子量 G タンパク質と結合することが知られている。結合する G 蛋白質の機能から推測される膜結合型 golgin の作用点は *in vitro* 再構成系による結果とは輸送方向の違いという大きな矛盾が生じている。

本研究は golgin タンパク質がゴルジ体構築に果たす役割を解析することを目的として、小胞体-ゴルジ間の繫留過程における作用点が明確になっていない膜結合型 golgin (golgin-84, CASP)に焦点を当てて解析する。

3. 研究の方法

研究目的の項目で述べたように本研究は golgin タンパク質がゴルジ体構築に果たす役割を解析することを目的として、培養細胞の siRNA を用いた RNA 干渉によるノックダウン (KD) を用いた *in vivo* 実験系を用いて、小胞体-ゴルジ間の繫留過程における膜結合型 golgin (golgin-84, CASP)に焦点を当てて解析する。まず、golgin-84, CASP の輸送における作用点および輸送の方向を決定し、各々と他のペリフェラルな golgin 及び他のゴルジ体構造維持因子との相互作用を検討する。

(1) golgin-84, CASP がゴルジ体の形態と機能維持に果たす役割解析。

形態：それぞれの膜結合型 golgin に対する siRNA を合成し、それぞれの golgin のノックダウン(KD)がゴルジ体の形態に及ぼす影響を、糖鎖付加酵素 N-acetylglucosaminyl transferase I および mannosidase II に対する蛍光抗体法を用いて観察し、比較する。また他の膜結合 golgin と GM130, GRASP65, p115, GCP170, p230, GCP60 などについても観察する。特に大きな影響を受けたものについては共役して働く可能性がある。また、

シス(GM130)とトランス(p230)のゴルジマーカーで共染色し、ゴルジ体極性構造の異常の有無を調べる。

機能：①小胞体→ゴルジ体：それぞれの golgin の siRNA による KD 細胞に温度感受性 VSV-G タンパク質を発現させ、その細胞内移行実験により輸送阻害の効果を検討する。②ゴルジ体層板間の逆行輸送：上記方法で発現した VSV-G タンパク質の糖鎖構造をレクチンを用いて調べる。異常がある場合、層板間逆行輸送により保たれるシストランス勾配が保持されず、糖鎖付加酵素が働けなくなっている事を示す。③ゴルジ体→小胞体：蛍光標識したシガトキシン B サブユニットの細胞表面から小胞体への輸送を観察する。これらの方法はすでに確立されている。

以上の解析から膜結合型 golgin が働く輸送経路がどこか明らかにする。

(2) golgin-84, CASP の結合タンパク質の検索。

4種の膜結合型 golgin はすべて細胞質側ゴルジ膜近くにゴルジ局在に必要な領域があることが明らかになっている (Misumi et al. **JBC** 2001, Gillingham et al. **MBC** 13.3761 2002, Jakymiw et al. **JBC** 275, 4137 2000)。Giantin のゴルジ局在化領域に可溶性 golgin GCP60 が結合していたことを踏まえ golgin-84, CASP, のゴルジ体局在領域を bait として酵母 two-hybrid によるスクリーニングを行う。

ラットゴルジ体画分を 1%TX100 で可溶化、固定化抗-golgin 抗体カラムにかける。結合タンパク質を 2D-PAGE で分画、未知のスポットについて MALDI-TOF 質量分析によりタンパク質を同定する。同時に TX100 可溶化ゴルジ画分を Superose6 ゲルろ過カラムで分離し、3種の golgin と共分離されるタンパクの解析を行い、2つの方法で得られた結果を比較し、結合タンパク質の候補とする。

(3) golgin-84, CASP の結合タンパク質の検索。

酵母 two-hybrid スクリーニングで陽性を示す、候補タンパク質について、GST 融合タンパク質を作成 *in vitro* pull-down 解析と導入発現細胞で tag を利用した免疫共沈を行う。これらの解析の後、それぞれの候補タンパク質の抗体の入手または作成を行う。

ラットゴルジ体を用いた免疫共沈により得られた候補タンパク質についても、cDNA の入手の後、*in vitro* pull-down 解析と、免疫共沈を行う。これから得られた最終候補タンパク質について抗体の入手または作成を行う。

4. 研究成果

(1) golgin-84 KD 細胞ではゴルジ体におけるゴルジ体層板の極性が乱れている。

golgins-84 KD 細胞において、形質膜糖タンパク質 CD44 とライソゾーム糖タンパク質 lamp1 をウェスタンブロット (WB) で解析すると、未成熟型糖鎖を持った分子種が見いだされた。この時、他の逆輸送関連因子である COG 複合体サブユニットの量に変化は見られなかった。同じ細胞でゴルジ体層板シス内腔に存在する GPP130 とトランス局在タンパク質である TGN46 の分布を観察すると、対象細胞で観察される 2 種のタンパク質の分布は golgin-84 KD 細胞では観察されなかった (図 1)。

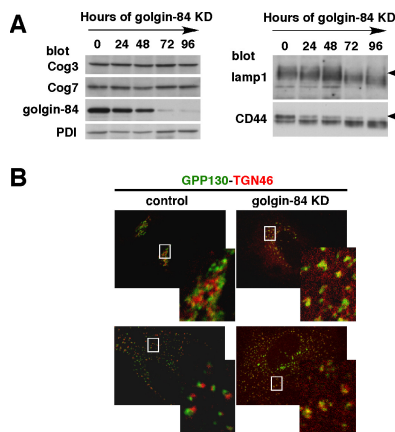


図 1

(2) golgin-84 KD 細胞では COPI 小胞の蓄積が観察される。

golgin-84 KD 細胞の COPI 小胞分布を蛍光染色と免疫電顕で観察すると、COPI 小胞の増加が見られた (図 2)。

(3) golgin-84 はゴルジ体層板間逆輸送

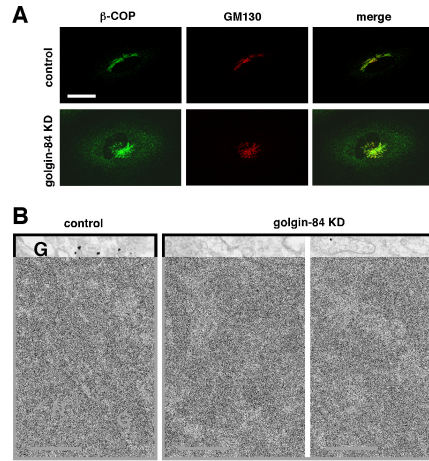


図 2

の繫留因子として同定されている COG 複合体と結合する。

in-vitro pull-down 解析の結果 golgin-84 は COG 複合体サブユニット Cog7 と結合することが示された。

(4) golgins-84 は COG 複合体と相互作用することで、ゴルジ体層板間逆輸送 COPI 小胞の繫留に働く。golgin-84 と COG 複合体の結合を siRNA による KD または結合ドメインの過剰発現によって阻害すると、COPI 小胞の融合に働く SNARE 複合体形成が阻害された (図 3)。

(5) golgins-84 と CASP の結合は

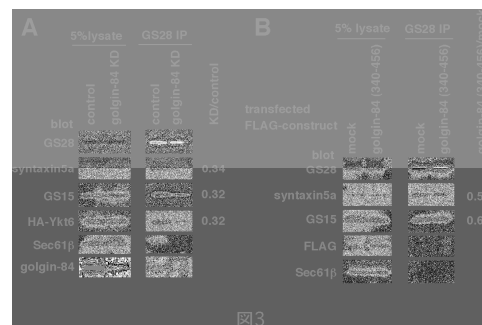


図 3

golgin-84 と COG 複合体の繫留後おこる。COG 複合体サブユニット Cog3 KD 細胞では golgin-84 と CASP の結合が阻害されることが見いだされた (図 4)。この結果は、golgin-84 と COG 複合体の結合は小胞が標的膜に結合する過程の早い段階でおこることを示す。

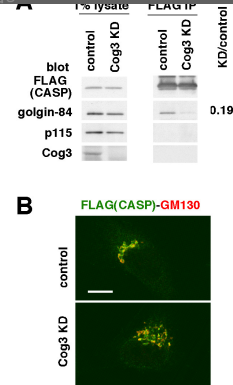


図 4

これらの結果をまとめると、ゴルジ体層板間逆輸送を担う COPI 小胞は小胞にある

golgin-84 が標的膜に存在する COG 複合体と結合することで膜融合過程の第一段階である繫留となる。その後小胞は標的膜に接着し SNARE 複合体の形成、他の膜融合因子（ここでは CASP）との相互作用などにより膜融合過程が進行する（図5）。

この結果はゴルジ体層板間小胞輸送において golgin と多量体複合体の相互作用が重要な機能を担っていることを初めて明らかにした。

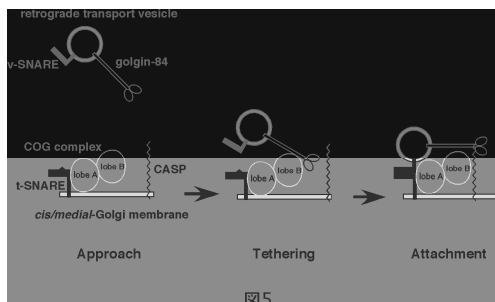


図5

を担っていることを初めて明らかにした。

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7件）

1. The novel cis-acting element GASE regulates transcriptional induction by the Golgi stress response. Oku M, Tanakura S, Uemura A, Sohda M, Misumi Y, Taniguchi M, Wakabayashi S, Yoshida H. Cell Struct Funct. 2011 Jan 12;36(1):1-12 (査読有)
2. Fission yeast ucp3 gene encodes a putative Arf6 GTPase-activating protein. Fujita A, Misumi Y. Mol Biol Rep. 2010 Nov 24. (査読有)
3. Interaction of golgin-84 with the COG complex mediates the intra-Golgi retrograde transport. Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Nakamura N, Ogata S, Sakisaka S, Hirose S, Ikehara Y and Oda K. Traffic (2010) 11:1552-1566 (査読有)
4. Fission yeast syt22 protein, a putative Arf guanine nucleotide exchange factor, is necessary for new end take off. Fujita A, Misumi Y FEMS Microbiol Lett (2009) 294:191-197 (査読有)
5. YIPF5 and YIF1A recycle between the ER and the Golgi apparatus and are involved in the maintenance of the Golgi structure. Yoshida Y, Suzuki K, Yamamoto A, Sakai N, Bando M, Tanimoto K, Yamaguchi Y, Sakaguchi T, Akhter H, Fujii G, Yoshimura SI, Ogata S, Sohda M, Misumi Y, Nakamura N. Exp Cell Res. (2008)

314(19):3427-3443 (査読有)

6. The Kv4 accessory protein DPPX is a critical regulator of membrane excitability in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Kim J, Nadal M, Clemens AM, Baron M, Jung SC, Misumi Y, Rudy B, Hoffman DA. J Neurophysiol. (2008) 100(4): 1834-1847 (査読有)
7. Molecular basis of perinatal hypophosphatasia with tissue-nonspecific alkaline phosphatase bearing a conservative replacement of valine by alanine at position 406. Numa N, Ishida Y, Nasu M, Sohda M, Misumi Y, Noda T, Oda K. FEBS J. (2008) 275(11):2727-2737 (査読有)

〔学会発表〕（計1件）

1. Miwa Sohda (代表), Yoshio Misumi, Akitsugu Yamamoto, Nobuhiro Nakamura, Kimimitsu Oda Interaction of golgin-84 with the conserved oligomeric Golgi (COG) complex mediates the intra-Golgi retrograde transport 第83回日本生化学会大会、2010年12月8日、神戸

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕無し

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三角 佳生 (MISUMI YOSHIO)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：10148877

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

相田 美和 (SOHDA MIWA)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：20258528