

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370091

研究課題名（和文） 細胞内小器官ゴルジ体・小胞体の各々における  
p97ATPase膜融合機構の解明

研究課題名（英文） p97ATPase-mediated membrane fusion in the ER and Golgi

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

研究成果の概要（和文）：

ゴルジ体の形成維持には、二つの異なった p97ATPase 膜融合経路が必要である。p97/p47 経路と p97/p37 経路である。VCIP135 は両経路に必要なが、その脱ユビキチン化活性は p97/p47 経路にしか必要とされない。今回、我々は新規の VCIP135 結合蛋白質である WAC を同定した。WAC はゴルジ体と核に局在する。ゴルジ体膜では、WAC は VCIP135 や p97 を含む複合体として存在している。WAC は、VCIP135 に直接結合し、その脱ユビキチン化活性を促進した。siRNA により WAC の発現を抑制するとゴルジ体は小胞化することから、WAC はゴルジ体の形成に必要であることが示された。試験管内ゴルジ体再構成系による実験から、WAC は p97/p47 経路にのみ機能し p97/p37 経路では働いていないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Two distinct p97 membrane fusion pathways are required for Golgi biogenesis: the p97/p47 and p97/p37 pathways. VCIP135 is necessary for both pathways, while its deubiquitinating activity is required only for the p97/p47 pathway. We have now identified a novel VCIP135-binding protein, WAC. WAC localizes to the Golgi as well as the nucleus. In Golgi membranes, WAC is involved in a complex containing VCIP135 and p97. WAC directly binds to VCIP135 and increases its deubiquitinating activity. siRNA experiments revealed that WAC is required for Golgi biogenesis. In an *in vitro* Golgi reformation assay, WAC was necessary only for p97/p47-mediated Golgi reassembly, but not for p97/p37-mediated reassembly.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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。その機能障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へ送られ、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、ゴルジ体特異的に働く p97ATPase による膜融合経路の因子を単離同定する。これにより、p97ATPase 膜融合経路の細胞内小器官に特異的な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

我々は、細胞内膜融合機構 p97/p47 経路に加えて、膜融合機構 p97/p37 経路を発見している。これら二つの経路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 p97/p47 経路が syntaxin5 を必要とするのに対して、p97/p37 経路は syntaxin5 でなくて GS15 を必要とする。p97/p37 経路は小胞繫留装置 p115-GM130 複合体を必要とするが、p97/p47 経路の小胞繫留装置については未だ不明である。

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 87 kDa の新規蛋白質を同定することが出来たので、それを WAC と命名した。WAC は、p97 存在下で VCIP135 と強く結合し、VCIP135/p97/WAC 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、WAC 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、WAC が結合することにより活性がやや上昇し、さらに VCIP135/WAC/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。

WAC 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 WAC 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 WAC の機能を検討した。その結果、WAC 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 WAC は機能していない事も明らかとなった。

WAC の発現を siRNA により抑制しても、小胞体の網状構造に差異が見られなかった。また、試験管内における小胞体の再構成実験でも、WAC は機能してなかった。従って、この WAC は、小胞体における p97/p47 経路の膜融合に機能していないと考えられた。即ち、WAC は、ゴルジ体の膜融合に特異的に機能する p97/p47 経路の因子と考えられた。

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 3 件)

1. Totsukawa G, Kaneko Y, Uchiyama K, Toh H, Tamura K, Kondo H., VCIPI35 deubiquitinase and its binding protein, WAC, in p97ATPase-mediated membrane fusion., EMBO J. 2011 Aug 2;30(17): 3581-93

2. Kaneko Y, Tamura K, Totsukawa G, Kondo H., Phosphorylation of p37 is important for Golgi disassembly at mitosis., Biochem Biophys Res Commun. 2010 Nov 5; 402(1): 37-41.

3. Kaneko Y, Tamura K, Totsukawa G, Kondo H., Isolation of a point-mutated p47 lacking binding affinity to p97ATPase., FEBS Lett. 2010 Sep 24;584(18):3873-7.

[学会発表] (計 7 件)

1. 近藤久雄 「p97ATPase による小胞体・ゴルジ体の形成維持機構」 第61回 日本細胞生物学会大会、2009年6月4日、愛知(名古屋国際会議場)

2. 金子弥生 「p97 ATPase-mediated biogenesis of the ER and Golgi」 The 5th Global COE International Symposium Cell Cycle and Differentiation、2010年2月25日、シンガポール (Temasek Life Sciences Laboratory)

3. 近藤久雄 「p97ATPase-mediated ER biogenesis」 The 3rd International Symposium on Proten Community、2010年9月13日、奈良(ホテル日航奈良)

4. 近藤久雄 GCOE 「p97 ATPase-mediated membrane fusion」 The 8th Global COE International Symposium Kyushu University - National University of Singapore Bilateral Workshop」、2011年8月23日、福岡(九州大学)

5. 十津川 剛 「VCIPI35 deubiquitinase and its binding protein, WAC, in p97 ATPase-mediated membrane fusion」 The 10th Global COE International symposium "Biochemistry and Cell Biology" 2011年12月22日、シンガポール (CeLS Auditorium,

National University of Singapore)

6. 田村かおり 「Identification of a novel factor in p97/p47-mediated Golgi membrane fusion pathway.」 The 6th Young Investigators Forum, 2011年2月12日、インドネシア (Angsana Resort & Spa Bintan Site A4 Lagoi)

7. 田村かおり 「A novel essential factor, p55, in p97/p47-mediated Golgi biogenesis, The 8th Young Investigators Forum "Cell Migration in Biology and Medicine", 2012年1月21日、福岡(九州大学)

[図書] (計 1 件)

田村かおり、森 沙也子、久保田章乃、近藤久雄: 「p97ATPase によるゴルジ体・小胞体の形成維持」細胞工学、Vol.30 No.11 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

[http://web.mac.com/hk228\\_01/Site/Kondo-Lab.html](http://web.mac.com/hk228_01/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

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

(3) 連携研究者