

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770216

研究課題名 (和文) ゴルジ体形成におけるモノユビキチンシグナルの役割の解明

研究課題名 (英文) Ubiquitin signaling in Golgi biogenesis

研究代表者

十津川 剛 (TOTSUKAWA, GO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90399684

研究成果の概要 (和文)：ゴルジ体形成必須因子であるVCIP135の結合タンパク質として、新規タンパク質p87を同定することに成功し、その機能解析を行った。p87はゴルジ体に局在し、ゴルジ体再構成の必須因子として働くことを明らかにした。細胞分裂期におけるゴルジ体再構成において、VCIP135/p87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が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：A novel VCIP135 binding protein is identified, and named as p87. p87 localizes to the Golgi, and works as an essential factor for Golgi assembly. It is suggested that ubiquitin signaling mediated by VCIP135/p87 plays an important role in Golgi biogenesis, especially in mitosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

我々の研究室では、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必須であることを明らかにしてきた。近年、申請者は

新たに p47 と相同性の高い新規タンパク質、p37 を同定し、p37 がゴルジ体形成必須因子である事を明らかにした。この p37 の同定により、細胞は、p97/p47 経路と p97/p37 経路の2つの異なる膜融合経路

を用いてゴルジ体形成をおこなっていることが明らかとなり、さらにこの2つの経路を比較する事で大変興味深い事が明らかとなった。1つが、細胞は膜融合経路を細胞周期により使い分けている事である。p97/p37 経路が間期におけるゴルジ体の形成維持に使われるのに対し、p97/p47 経路は細胞分裂期におけるゴルジ体の再構成に特化した膜融合経路である事が明らかとなった。もう1つはVCIP135の関与である。VCIP135はゴルジ体形成必須因子として同定したタンパク質であり、脱ユビキチン活性を持つ。この2つの膜融合経路はともにVCIP135を必須因子として必要とする。しかしその脱ユビキチン活性については、p97/p37 経路では必要ないのに対し、p97/p47 経路では脱ユビキチン活性を必要とすることがわかった。これは明らかにゴルジ体形成において、VCIP135が異なる機能を有するタンパク質である事を示している。VCIP135の機能を明らかにする事は、ゴルジ体形成の分子機構を明らかにするうえで重要な知見を与えるものと考えられる。

細胞分裂期におけるp97/p47 経路を介したゴルジ体再構成には、VCIP135の脱ユビキチン活性、つまりユビキチンの関与が非常に重要な役割を果たしている事が明らかとなってきた。細胞分裂期にはゴルジ体は劇的な形態変化を見せる。この形態変化とユビキチンシグナルは密接に関係していると考えられる。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、細胞分裂期における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、ユビキチンを介したゴルジ体形成の分子機構の解明を目的とする。細胞分裂期においてVCIP135はゴルジ体再構成に必須なタンパク質であるだけでなく、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。ところが、VCIP135のリコンビナントタンパク質は、全長ではその脱ユビキチン活性は非常に低く、N末断片にすると顕著に活性が上昇することを見出した。この結果は、VCIP135に何らかの活性化機構が存在していると示唆する。

申請者は最近、新たなVCIP135結合タンパク質、p87の同定に成功した。さらに、p87がゴルジ体に局在し、VCIP135の脱ユビキチン活性を活性化するという非常に興味深い結果を得た。このことはp87がVCIP135の活性制御に重要な役割を果たしている可能性を強く示唆する。そこで本研究では、1) p87の機能を明らかにすることにより、VCIP135の脱ユビキチン化の活性化機構を詳細に検討する。

また、VCIP135の脱ユビキチン活性が細胞分裂期のゴルジ体再構成に必須ということから、細胞分裂期において、小胞化されたゴルジ体膜上にVCIP135によって脱ユビキチン化されるタンパク質が存在し、かつ、このユビキチン化が何らかのシグナルとしてゴルジ体再構成に必須である事を示唆する。そこで、2) ゴルジ体再構成におけるVCIP135のターゲット(基質)タンパク質の同定を行う。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。このタンパク質を同定し、ゴルジ体形成における機能を明らかにする事により、ゴルジ体形成におけるユビキチンの役割が明らかとなると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) p87の機能

p87のGST融合タンパク質を作製し、His-VCIP135および、His-p97を用いてGSTプルダウン法により、3者の結合を検討した。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。p87をノックダウンした細胞を間接蛍光抗体法を用いて、ゴルジ体の形態を検討した。さらに、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。抗p87抗体を用いて、試験管内ゴルジ体再構成実験をおこない、p87のゴルジ体形成への関与を検討した。VCIP135の脱ユビキチン活性はpoly-ubiquitin chainを基質に用いることで、その活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) p87の機能

p87は単独でVCIP135に結合を示すが、p97存在下において、VCIP135への結合が顕著に増大した。また、p87は単独でVCIP135の脱ユビキチン活性を活性化するが、同様にp97存在下において、VCIP135の脱ユビキチン活性を顕著に増大した。これは、p87/VCIP135/p97が3者による複合体を形成し、機能することを示唆するものである。

抗p87抗体を用いて培養細胞を免

疫染色すると、p87は主にゴルジ体に局在することが明らかとなった。また、RNAi法を用いて内在性のp87をノックダウンすることに成功した。p87のノックダウンにより、免疫染色においてゴルジ体が断片化した像が観察された。電子顕微鏡による観察においても、ゴルジ体の扁平膜積層構造が消失し、断片化している像が観察された。これらの結果は、p87がゴルジ体の形態形成に必須因子として働いていることを示唆している。

さらに、試験管内ゴルジ体再構成実験をおこない、p87の機能を詳細に検討した。抗p87抗体を用いてp87の機能を阻害すると、ゴルジ体形成が顕著に阻害されることを示した。しかしながら、抗p87抗体は、細胞分裂期のゴルジ体再構成特異的に働くp97/p47膜融合経路にのみ阻害効果を示し、細胞周期間期のゴルジ体形態維持に働くp97/p37膜融合経路には、阻害効果を示さないことが明らかとなった。

以上の結果から、p87は、p97/p47膜融合経路によるゴルジ体再構成にのみ働く必須因子であり、同時に、p97存在下でVCIP135の脱ユビキチン活性を活性化するタンパク質であることが明らかとなった。一方、VCIP135の脱ユビキチン活性がゴルジ体再構成において必須であることが既に報告されている。本研究の結果は、細胞分裂期におけるゴルジ体再構成において、VCIP135/p87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強く示唆するものである。

## 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 2 件)

1) Kaneko, Y., Tamura, K., **Totsukawa, G.**, and Kondo, H. (2010) Phosphorylation of p37 is important for Golgi disassembly at mitosis. *Biochem Biophys Res Commun* 402, 37-41. 査読有り

2) Kaneko, Y., Tamura, K., **Totsukawa, G.**, and Kondo, H. (2010). Isolation of a point-mutated p47 lacking binding affinity to p97ATPase. *FEBS Lett* 584, 3873-3877. 査読有り

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

十津川 剛 (TOTSUKAWA, GO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：90399684