

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06154

研究課題名(和文) p97ATPase/p47複合体による新規ゴルジ膜係留機構

研究課題名(英文) p97ATPase/p47-mediated membrane tethering system

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体・小胞体の形成において、p97/p47による膜融合が重要であり、その必須因子としてVCIP135がある。本研究ではまず、VCIP135とp97は異なる二つの結合様式で複合体を形成することが明らかにした。次に、VCIP135の2箇所のp97結合領域それぞれにおいてp97と結合しない変異体の同定し、ゴルジ体・小胞体共にその特徴的な形態の形成維持にp97-VCIP135複合体形成が必要であることが示された。さらに興味深いことに、その際にはp97-VCIP135複合体中の二つの結合の両方共が必要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、VCIP135がp97ATPaseのN末端とC末端の両方にATP依存性に結合することを見いだしたが、このようなp97結合蛋白質は今まで知られていない。このことから我々はVCIP135がp97複合体の解離因子として働くという仮説を提唱した。特に新規係留装置であるFTCD-p97/p47-FTCD複合体においてp97はN末端とC末端でそれぞれFTCDとp47とに結合するが、VCIP135はその両方の結合を同時に解離し得る。またp97-p47間の結合が解離すると、p47-FTCD間の結合も弱くなり解離に至る。即ち、VCIP135が膜係留装置のリサイクル因子である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：VCIP135 is necessary for p97/p47-mediated Golgi membrane fusion. Although VCIP135 is known to form a complex with p97 in the cytosol, the role of this complex in Golgi and ER biogenesis has remained unclear. In this study, we demonstrated that VCIP135 has two distinct p97-binding sites at its N- and C-terminal regions. We also clarified that the N- and C-terminal binding sites in VCIP135 interact with the C- and N-terminal regions of p97, respectively. These two interactions within the complex are synchronously controlled by the nucleotide state of p97. We next generated VCIP135 mutants lacking each of the p97-binding sites to investigate their functions in living cells, and clarified that VCIP135 is involved in Golgi and ER biogenesis through its two distinct interactions with p97. VCIP135 is hence a unique p97-binding protein that functions by interacting with both the N- and C-terminal regions of p97, which strongly suggests that it plays crucial roles in p97-mediated events.

研究分野：細胞生物学

キーワード：膜融合 ゴルジ体 小胞体 p97ATPase

1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体は細胞の根幹をなすオルガネラであり、扁平膜が積層した特徴的な形態を示す。申請者は、ゴルジ体の細胞周期間期における維持に働く p97/p37 経路と、分裂期でのゴルジ体再構成に必須な p97/p47 経路という二つの p97ATPase 膜融合経路を発見してきた。

膜融合では膜同士の選択性が重要となるが、それは Rab 蛋白質を伴う膜係留機構が担うと考えられている。このように膜係留は膜融合において極めて重要な段階であり、p97/p37 経路においては NSF 経路と同様に p115-GM130 複合体による膜係留を我々は報告してきたが (Dev Cell 2007) p97/p47 経路の膜係留については全く不明であった。SNARE 分子の活性化 (SNARE priming) に機能するとされてきた p97/p47 複合体であるが、幸いにもこの程我々は、その p97/p47 複合体自身が酵素 formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD) と係留複合体 FTCD-p97/p47-FTCD を形成して膜係留をも司っていたことを明らかにした (EMBO J 2020、図1参照)。即ち、p97/p47 複合体は、驚くべきことに、膜係留と SNARE priming という二つの機能を一つの膜融合過程で果たしていた。

膜融合は複雑な多段階反応からなっており、「膜係留」「SNARE 複合体形成」「脂質二重膜の融合」「SNARE priming、膜係留の解除」と、順々に進行する。そのためには、各段階反応の時間的空間的な連結が必要であるが、膜融合全般でその機序が解明されたものはない。p97/p47 複合体が多段階で共有されて機能する p97/p47 経路は、膜融合の各段階反応の連携を解析するのに適している。

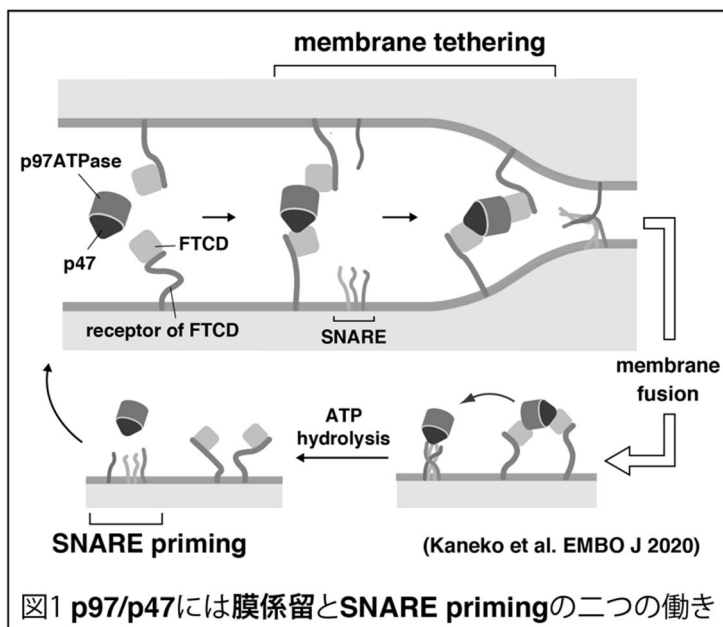


図1 p97/p47には膜係留とSNARE primingの二つの働き

2. 研究の目的

p97ATPase は p47 と複合体を形成する。この p97/p47 複合体は、膜融合の最初の段階で、ゴルジ膜同士を係留するために働く。この係留のためには p97/p47 複合体は、ゴルジ上の FTCD 分子を連結する形で係留複合体 FTCD-p97/p47-FTCD を形成する。その後膜融合は、「SNARE 複合体形成」「脂質二重膜の融合」と進行し、最後に「膜係留の解除、SNARE priming」の段階を迎える。p97/p47 膜融合経路ではこの最後の段階において、係留複合体 FTCD-p97/p47-FTCD が解離され、放出された p97/p47 複合体が SNARE 複合体へ作用する必要があると考えられる。

そこで本研究では係留複合体 FTCD-p97/p47-FTCD を解離する因子を同定しようと試みた。我々が以前に発見していた p97/p47 膜融合の必須因子 VCIP135 をその候補と考えて、VCIP135 と p97 との相互作用を改めて解析し直す過程で、予想外なことに、VCIP135 は特異な p97ATPase 結合蛋白質であることが判明した。

3. 研究の方法

本研究ではまず、VCIP135 の断片化した種々のリコンビナント蛋白質を作成して、p97 との結合性を検討した所、VCIP135 は(1-390 a.a.)と(903-1053 a.a.)の2カ所に p97 結合領域を持つことを明らかにした。

次に、p97 上の VCIP135 結合領域 p97 断片化リコンビナント蛋白質を調製して検討した結果、VCIP135(1-390)は p97(725-806)に、VCIP135(903-1053)が p97(1-198)にそれぞれ結合することが示された。即ち、VCIP135 と p97 は異なる二つの結合様式で複合体を形成することが明らかになった。

そこでさらに、VCIP135 の2箇所の p97 結合領域それぞれにおいて、p97 と結合しない変異体の同定を試みた。具体的には、PCR 法を用いて p97 結合領域に人為的に変異を導入し、それを Yeast-two-hybrid 法によってスクリーニングした。結果、VCIP135N 末の結合領域では変異(L133S)、VCIP135C 末の結合領域では変異(F1024L, L1031P)をそれぞれ同定することに成功した。このとき同時に、VCIP135C 末の結合領域が、p47、p37、UFD1 に共通して見られる p97 結合性のアミノ酸配列 SHP motif を含むことも明らかになった。これらの変異について、VCIP135 全長を

用いて p97 との結合を検討したところ、二つの p97 結合領域の両方に変異を入れた VCIP135(L133S, F1024L, L1031P)は p97 結合性を示さなかった。また、片方の p97 結合領域だけに変異を入れた VCIP135 (L133S) と(F1024L, L1031P)は依然と p97 と複合体を形成することが可能であった。さらには、これらの二つの結合は、p97 のヌクレオチド状態によって同調して制御されることも明らかになった。

最後に、これらの VCIP135 変異体を用いて、VCIP135 と p97 の複合体形成がゴルジ体・小胞体の形態形成維持に必要かどうかを *in vivo* で検討した。結果、ゴルジ体・小胞体共に、その特徴的な形態の形成維持に p97-VCIP135 複合体形成が必要であることが示された。さらに興味深いことに、その際には p97-VCIP135 複合体中の二つの結合の両方共が必要であった。

4. 研究成果

p97 の N 末端と C 末端の両方に結合する蛋白質は今まで知られて居らず、VCIP135 が極めてユニークな p97 結合蛋白質であることを明らかにし、このことから我々は VCIP135 が p97 複合体の解離因子として働くという仮説を提唱した。特に、FTCD-p97/p47-FTCD 複合体において、p97 は N 末端と C 末端でそれぞれ FTCD と p47 とに結合するが、VCIP135 はその両方の結合を同時に解離し得る。また p97-p47 間の結合が解離すると、p47-FTCD 間の結合も弱くなり解離に至る。即ち、VCIP135 が膜係留装置のリサイクル因子である可能性がある。

これらの成果は以下に報告している。

[Nakayama S](#) and Kondo H.

VCIP135 associates with both the N- and C-terminal regions of p97ATPase.

J Biol Chem, 2024, vol 300, 105540. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105540.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yayoi Kaneko, Kyohei Shimoda, Rafael Ayala, Yukina Goto, Silvia Panico, Xiaodong Zhang, Hisao Kondo	4. 巻 40
2. 論文標題 p97 and p47 function in membrane tethering in cooperation with FTCD during mitotic Golgi reassembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020105853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzune Nakayama, Hisao Kondo	4. 巻 300
2. 論文標題 VCIP135 associates with both the N- and C-terminal regions of p97ATPase.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 105540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.105540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------