

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究課題

「細胞内ゴルジ体・小胞体の形態
異常と病態症状」

研究期間：平成14年3月1日～平成17年3月31日

研究代表者

近藤 久雄

Principal Investigator, CIMR, University of Cambridge

三菱化学生命科学研究所 主任研究員

1 . 研究実施の概要

細胞内小器官である小胞体とゴルジ体は、蛋白質の産生・修飾・輸送に重要な働きをしており、それぞれ網状構造と扁平膜積層構造という特徴的な形態を示す。これらの特異的な形態とその機能は、ショウジョウバエから哺乳類まで種を越えて良く保存されている。このことは即ち、その機能がその形態と密接に関連していることを、強く示唆している。本研究では、小胞体・ゴルジ体の形成機構を解明することを目的とし、最終的にそれらの特殊な形態が機能と如何に関連しているかを明らかにすることを目指した。

一方で、それらの形態異常は、種々の神経変性疾患を初めとして、脳梗塞・心筋梗塞など、様々な疾患で報告されている。それら形態異常は疾患進行の初期より見られることが多く、その病態形成に大きな影響を及ぼしていると考えられてきた。ただ残念ながらこれまで、それら細胞内小器官の形態異常を来す病理メカニズムとそれらの病態意義について、殆ど研究が進んでいないのが現状であった。本研究では、細胞内小器官の形態異常を来すモデル細胞を人為的に作成することにより、様々な病理条件下で観察されるそれら細胞内小器官の形態異常の病理的意義を明らかにする事も併せて目指した。

研究成果は以下の通りである。

細胞内小器官である小胞体・ゴルジ体の形成の分子機構

- 小胞体・ゴルジ体の形成に必須な膜融合機構p97/p47経路の新規因子として、VCIP135とp55を単離同定し、そのcDNA配列を決定した。
- ゴルジ体形成・維持に必須である、全く新規の膜融合機構を発見した。我々は、これをp97/p37経路と命名した。
- 細胞を固定すると小胞体の形態は容易に失われてしまう。そこで、小胞体を生細胞で可視化できるようにした培養細胞株を樹立し、細胞固定なくして小胞体の形態を観察できるシステムを作り上げた。
- 我々が先に発見した膜融合複合体p97/p47の部分結晶構造を明らかにした。

様々な生理条件や病態における小胞体・ゴルジ体の形態変化の分子機構

- 細胞分裂期におけるゴルジ体の形態変化の分子機構を明らかにした。即ち、ゴルジ体が細胞分裂期に小胞化してその後娘細胞で再構成される分子メカニズムとして、p47の細胞内局在とそのリン酸化を見いだした。p47変異蛋白を微量注入することにより、細胞分裂期でもゴルジ体の層

板構造を保つことに初めて成功し、ゴルジ体の小胞化がゴルジ体の娘細胞への均等分配に必ずしも必要でないことを初めて報告した。

- 患者血清に抗ゴルジ自己抗体が認められる膠原病の症例を明らかにした。その病態機序の解明のため、自己抗体の抗原を同定し、病態との関連を示した。

2 . 研究構想

細胞内小器官である小胞体とゴルジ体は、蛋白質の産生・修飾・輸送に重要な働きをしており、それぞれ網状構造と扁平膜積層構造という特徴的な形態を示す。これらの特異的な形態とその機能は、ショウジョウバエから哺乳類まで種を越えて良く保存されている。このことは即ち、その機能がその形態と密接に関連していることを、強く示唆している。本研究では、小胞体・ゴルジ体の形成機構を解明することを目的とし、最終的にそれらの特殊な形態が機能と如何に関連しているかを明らかにすることを目指した。

一方で、それらの形態異常は、種々の神経変性疾患を初めとして、脳梗塞・心筋梗塞など、様々な疾患で報告されている。それら形態異常は疾患進行の初期より見られることが多く、その病態形成に大きな影響を及ぼしていると考えられてきた。ただ残念ながらこれまで、それら細胞内小器官の形態異常を来す病理メカニズムとそれらの病態意義について、殆ど研究が進んでいないのが現状であった。本研究では、細胞内小器官の形態異常を来すモデル細胞を人為的に作成することにより、様々な病理条件下で観察されるそれら細胞内小器官の形態異常の病理的意義を明らかにする事も併せて目指した。

3 . 研究内容

(1)実施の内容

細胞内小器官である小胞体・ゴルジ体の形成の分子機構

A. VCIP135の発見

我々が先に見つけた膜融合経路p97/p47経路の必須因子として、分子量135KDaの蛋白を単離同定することに成功した。そのcDNAをクローニングしたところ、1221アミノ酸から成る全くの新規蛋白であることが明らかとなり、VCIP135と命名した。

VCIP135は膜融合複合体であるp97/p47とsyntaxin5とに結合して、ATP加水分解依存性に複合体を解離する。その時に、膜上の受容体であるsyntaxin5が活性化さ

れると考えられた。

このVCIP135はゴルジ体のみならず小胞体・核膜にも存在し、その抗体を生細胞にマイクロインジェクションすると、ゴルジ体・小胞体の高次形態は失われた。これは、p97/p47経路の膜融合活性を実際に *in vivo* で示した最初の報告である。

B. p55の発見

VCIP135に引き続いて、膜融合経路p97/p47経路の必須因子として、55KDaの蛋白を単離同定することに成功した。この蛋白はp97 ATPaseの補因子であるp47の結合蛋白として単離された。そのcDNAをクローニングしたところ、450アミノ酸から成る新規蛋白と分かり、p55と命名した。

試験管内ゴルジ体再構成系に、p55に対する抗体を加えると、p97/p47/VCIP135によるゴルジ体膜の融合は完全に阻害された。また、この抗p55抗体を生細胞にマイクロインジェクションすると、ゴルジ体の層板構造は完全に失われ小胞化した。従って、p55は膜融合機構p97/p47/VCIP135経路の新規因子であり、ゴルジ体の形態形成に必須の因子であることが示された。

抗p55抗体を用いての免疫沈降法によりp55の結合蛋白を検索した結果、このp55は細胞骨格microtubuleと結合することも分かった。このことは、p55が膜融合と細胞骨格を繋ぐ鍵となる重要な因子である事を強く示し、ゴルジ体の核近傍への局在性の分子機構を解明する重要な一步になると考えられる。

C. 新規の膜融合経路、p97/p37の発見

p97 ATPaseの新規補因子であるp37を発見することに成功した。そのcDNAクローニングの結果、この蛋白は310アミノ酸から成る新規蛋白で、p37と命名した。このp37は、細胞質上清に於いてp97と複合体を形成して存在することが分かった。

試験管内ゴルジ体再構成系において、この新規複合体p97/p37を加えたところ、p47の存在なしでゴルジ体膜の融合が起こった。またその時には、p97/p47経路に含まれる受容体syntaxin5は必要なく、全く別の受容体が必要と考えられ、現在その同定に努めている。

従来のp97/p47経路は細胞分裂期の終期における娘細胞でのゴルジ体・小胞体の再構成に必要である。しかるに一方、この新規補因子p37は核移行シグナルを持たず主に細胞質に存在し、細胞間期でのゴルジ体・小胞体の形態維持に働くと考えられた。事実、細胞間期の細胞質に抗p37抗体をマイクロインジェクションすると、ゴルジ体の層板構造は完全に失われ小胞化した。

D. 膜融合複合体p97/p47の分子構造の解明

英国Imperial CollegeのFreemontのグループとの共同研究で、NMR法を用いてp97 ATPaseの補因子p47の構造の解明に成功。また、p97とp47の部分複合体の結晶構造の解析に成功した。

様々な生理条件下や病態下における小胞体・ゴルジ体の形態変化

A. ゴルジ体の細胞周期による形態変化の分子機構の解明

ゴルジ体の層板積層構造は、細胞分裂期にはいると、小胞化して細胞質全体に分散する。細胞質分裂後、娘細胞において再びゴルジ体の層板積層構造が再構成される。このゴルジ体の細胞分裂期での消失には膜融合機構の阻害が必要であるが、その阻害機構は不明であった。本研究で、p97 ATPaseの補因子p47の140番目のSerineがCdc2キナーゼによりリン酸化されて、その結果、リン酸化されたp47は膜に結合できなくなり、膜融合は阻害されてゴルジ体が小胞化することを見いだした。

そこで今度は、リン酸化されないように変異したp47蛋白を生細胞にマイクロインジェクションすることにより、細胞分裂期でもゴルジ体の層板構造を保つことに初めて成功した。このモデル細胞を用いて、細胞分裂時のゴルジ体の娘細胞への分配を検討したところ、ゴルジ体の小胞化がその娘細胞への均等分配に必ずしも必要でないことを証明でき、従来通説を覆すことになった。

B. 膠原病の病態進行と抗ゴルジ体自己抗体

重症の筋炎・筋萎縮の症状を呈する膠原病患者の血清中に抗ゴルジ自己抗体が認められる症例を検討した。その患者の自己抗体を用いて抗原を免疫沈降し、その抗原を質量分析にて検討した。その結果、抗原はゴルジ体に局在する蛋白Giantinであることが明らかとなった。

この自己抗体を試験管内ゴルジ体再構成系に加えてみると、ゴルジ体の形成が阻害され、このGiantin蛋白がゴルジ体の形成に必須であることが分かった。従って、この自己抗体が、病態骨格筋細胞において作用し、そのゴルジ体形成を阻害していることが予想された。そこで実際に、患者の骨格筋を生検し病理診断したところ、確かにゴルジ体が断裂・小胞化していた。

また臨床データの検討から、筋炎の進行と患者血清中の自己抗体価は高い相関を示していた。現在は、この抗ゴルジ自己抗体価が病態進行や予後の良い指標となることを期待して、より多くの症例を集めている所である。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

ゴルジ体・小胞体の形成に必要な膜融合経路として現在までに知られているのは、

NSF経路とp97経路の二つのみである。そのうちのp97経路について、代表者は一貫して研究を進めている。これまで見つかっているp97経路の5つの因子は全て代表者が発見したものである。また、その機能を初めてin vivoで証明したのも代表者である。この分野において、我々が世界のトップを走っており、他の追隨を許していない。

本研究は、これら細胞内小器官の形態と機能の関係を明らかにすることで、疾病を細胞内小器官のレベルで語ることを目指した。これらの基礎研究成果の蓄積により、従来の細胞・物質単位で語られた生物学とは異なる細胞内小器官レベルでの医学の世界が開けることが期待できる。

4 . 研究実施体制

(1)体制

近藤グループのみ

(2)メンバー表

近藤グループ (テーマ別)

氏 名	所 属	役 職	参加時期
近藤 久雄	ケンブリッジ大学 医科学研究所	主任研究員	平成14年3月～平成17年3月
内山 圭司	ケンブリッジ大学 医科学研究所	訪問研究員	平成14年3月～平成17年3月
沖米田 司	ケンブリッジ大学 医科学研究所	JST研究員	平成15年4月～10月
Eija Jokitalo	ヘルシンキ大学	主任研究員	平成14年3月～平成17年3月

5 . 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

なし

(2)招聘した研究者等

なし

6 . 主な研究成果

(1)論文発表 (国内 1件、海外 11件)

1. Kano F, Kondo H, Yamamoto A, Tanaka AR, Hosokawa N, Nagata K, Murata M. The maintenance of the endoplasmic reticulum network is regulated by p47, a cofactor of p97, through phosphorylation by cdc2 kinase. *Gene Cells* 10: 333-344, 2005
2. Kano F., Tanaka A., Yamauchi S., Kondo H., Murata M. Cdc2 kinase-dependent disassembly of ER exit sites inhibits ER-to-Golgi vesicular transport during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* 15:4289-98,2004
3. Yuan X., Simpson P., Kondo H., Mckeown C., Dreveny I., Zhang X., Freemont P., Matthews S. Complete Backbone Resonance Assignments of p47: The 41kDa Adaptor Protein of the AAA ATPase p97. *J Biomol NMR.*, 28:309-10, 2004
4. Sahashi K., Ibi T., Ohno K., Sahashi K., Nakao N., Kondo H. Progressive myopathy with circulating autoantibody against giantin in the Golgi apparatus. *Neurology*, 62:1891-1893, 2004
5. Dreveny I., Kondo H., Uchiyama K., Shaw A., Zhang X., Freemont P. Structural basis of the interaction between p97/VCP and its adaptor protein p47. *EMBO J.*, 23:1030-9, 2004
6. Yuan X., Simpson P., Mckeown C., Kondo H., Uchiyama K., Wallis R., Dreveny I., Zhang X., Freemont P., Matthews S. Structure, dynamics and interactions of p47, a major adaptor of the AAA ATPase, p97. *EMBO J.*, 23:1463-73, 2004
7. Huyton T., Zhang X., Pye V., Flynn T., Kondo H., Ma J., Freemont P. The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J. Structural Biol.*, 144:337-48, 2003
8. Uchiyama K., Jokitalo E., Lindman M., Jackman M., Kano F., Murata M., Zhang X., Kondo H. The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi disassembly-assembly during the cell cycle. *J. Cell Biol.*, 161:1067-1079, 2003
9. Beuron F., Zhang X., Kondo H., Freemont P. Structure of a membrane fusion adaptor: the p97/p47 protein complex. *J. Mol. Biol.*, 327:619-629, 2003
10. Uchiyama K., Jokitalo E., Kano F., Murata M., Zhang X., Canas B., Newman R., Rabouille C., Pappin D., Freemont P., Kondo H. VCIP135, a novel essential

factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo. *J. Cell Biol.*, 159: 855-866, 2002

11. Uchiyama K., Kondo H. p97-mediated biogenesis of Golgi apparatus (invited review). *J. Biochemistry*, 137: 115-119
12. 内山圭司、沖米田司、近藤久雄 「ゴルジ体・小胞体形成に必須な p97 細胞内膜融合機構」(総説)、「蛋白質核酸酵素」49: 916-919, 2004

(2) 口頭発表

招待、口頭講演 (国内 1件、海外 5 件)

1. Freemont P., et al. Structure of the AAA ATPase p97, International Meeting on Cellular Function of AAA Proteins, 2002
2. Zhang X., et al. Structural Studies on AAA ATPase p97 in Membrane Fusion Pathway, Complementary Methods in Structural Biology, 2002
3. Beuron F., et al. Three-dimensional reconstruction of the AAA ATPase p97 and its complexes with p47, ICEM 15 meeting, 2002
4. Zhang X., et al. Structures of the membrane fusion AAA ATPase p97 and associated adaptors, Euresco conference "Exocytosis: Membrane Structure and Dynamics", 2002
5. Sahashi K., et al. Limb-girdle type myopathy with circulating autoantibody against giantin in Golgi apparatus. Xth International Congress on Neuromuscular Diseases, 2003
6. 近藤久雄 他、p97-mediated membrane fusion、第27回日本分子生物学会ワークショップ「AAA蛋白質の機能と構造」、2004

ポスター発表

なし

(3) 特許出願

なし

(4) 新聞報道等

なし

(5) その他特記事項

なし

7 . 結び

自分の価値観によると思うのだが、どうしても応用研究よりも基礎研究指向になってしまう。そのため、本研究では、細胞内小器官の形成機構を検討する方向性の研究を優先した。また、それに関連する仕事が予想外に進展したのも事実である。結果として、病態下に於ける細胞内小器官の形態異常を来す分子メカニズムの研究は余り進展しなかった。