

## 研究課題別研究評価

1. 研究課題名： 細胞内小器官ゴルジ体はなぜ特徴的な層板構造をとるのか

2. 研究者名： 近藤 久雄

3. 研究のねらい：

細胞を構成する細胞内小器官はそれぞれ特有な形をしているが、その形態はどうやって形成され、そしてその機能とどのような関係にあるのであろうか。細胞内小器官を形成するためには、細胞内膜融合が必要であるが、その内の主要な経路の一つ、p97/p47 経路の新規必須因子を同定することにより、細胞内小器官の形成過程を明らかにする。

4. 研究結果及び自己評価：

### 研究結果

1) 膜融合因子 p97/p47 複合体の解析

まず様々な p47 の deletion mutant の解析から p47 には二つの p97 結合領域が有ることを明らかにした。また同時に、共同研究で行った p97 と p47 の結晶解析の結果から、p97 の N 末端には二つのサブドメインがあることが分かり、p47 の一つの結合領域は p97 の一つのサブドメインに結合し、p47 のもう一つの結合領域は p97 の二つのサブドメインを繋ぎ止めるように結合していた。即ち、p97/p47 複合体が二つの異なった相互作用によって維持されていることが明らかとなった。

2) 新規因子 VRF135 の同定・単離ならびにクローニング

この p97/p47 複合体を解離するような因子があるとの仮説に基づいて、解離因子の同定・単離を試みた。その結果、分子量 135kDa の蛋白が得られた。その部分アミノ酸シーケンスから全長 cDNA を単離したところ、アミノ酸 1221 個からなる新規蛋白であり、VRF135[p97(V CP)-R recycling F factor p135]と命名した。

3) VRF135 の生化学的・機能的な役割の解明

p135 は、細胞質上清に加えて、ゴルジ体・小胞体にも存在することが、免疫電子顕微鏡と蛍光顕微鏡を用いた観察から明らかとなった。そこで、ゴルジ体と小胞体上の VRF135 の受容体を検討した結果、それぞれ syntaxin5 と syntaxin18 (以下 SNAREs と略)とを結合していることを明らかにした。p135 は p97/p47/SNARE 複合体を ATP 加水分解依存的に解離し、膜融合機構因子 p97 と p47 をリサイクルすることが分かった。

また、試験管内ゴルジ体再構成系を用いてゴルジ体における p135 の機能を検討し、p97/p47 経路によるゴルジ体膜の融合には p135 が必須であることが明らかにした。さらに、抗 VRF135 抗体を生細胞に微量注入したところ、ゴルジ体の層板構造が阻害され、加えて小胞体の網状構造形成・核膜形成も阻害された。以上から、p135 はゴルジ体・小胞体・核膜の形成に必須の因子であり、p97/p47/SNARE 複合体をリサイクルする因子と考えられる。

4) ゴルジ体・小胞体・核膜形成に必要な膜融合機構 p97/p47/VRF135 の細胞周期調節

細胞周期分裂期においてゴルジ体・小胞体・核膜がその特徴的な形態を失って小胞化するが、その機構は膜融合の阻害によると考えられてきたが、その実体は全く不明であった。今回、p97 経路の因子 p47 が分裂期にリン酸化される事を発見し、それが分裂期の膜融合機構の阻害機構であることを明らかにした。

### 自己評価

事業団との契約やラボの立ち上げに最初の 1 年が取られ、実質的にスタート出来たのが 2 年目に入ってからであることを考えると、その後は順調に出来たと考えられる。最初はゴルジ体形成に必須

な膜融合因子を探索していたのであるが、いざ単離したところ、小胞体や核膜の形成にも必須の因子であることが分かったのは意外であり、研究の楽しさを感じた。

#### 5. 領域総括の見解

細胞内小器官ゴルジ体は、細胞分裂中に小胞に分かれ、分裂後ゴルジ体が再生される。その仕組みに関与する因子としてp97とp47が知られていたが、本研究によって分子量135kDa(1221個のアミノ酸からなる)のVRF135の関与が発見された。この新因子は小胞が融合してゴルジ体をつくる際に必須である。VRF135はp97/p47のATPを分解して解離させる。解離したp47がリン酸化されると小胞の融合は起こらない(細胞分裂時)。本研究は、謎とされたゴルジ体の消失・再形成の仕組みに新しい知見をもたらしたものであり、細胞生物学上画期的な成果といえよう。本さきがけ研究で期待し得る最大のアウトプットのひとつである。

#### 6. 主な論文等：

【原著論文】最も主要な成果は論文1)に発表

- 1) Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Murata, M., Zhang, X., Rabouille, C., Newman, R., Canas, B., Pappin, D., Freemont, P., and Kondo, H. VRF135, a novel essential factor for p97-mediated membrane fusion, functions for Golgi and ER assembly in vivo. submitted to Cell(2回目のrevise中)
- 2) Yuan, X., Shaw, A., Zhang, X., Kondo, H., Lally, J., Freemont, P. S., and Matthews, S. (2001). Solution structure and interaction surface of the G-terminal domain from p47: a major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. J. Mol. Biol, 311, 255-263
- 3) Zhang, X. D., Shaw, A., Bates, P. A., Newman, R. H., Gowen, B., Orlova, E., Gorman, M. A., Kondo, H., Dokurmo, P., Lally, J., Leonard, G., Meyer, H. E., van Heel, M. & Freemont, P. S. (2000). Structure of the AAA ATPase p97. Mol. Cell, 6, 1473-1484.

【招待講演】

- ・近藤久雄 「細胞内膜融合機構 p97/p47 経路の細胞周期調節」、第54回日本細胞生物学会シンポジウム「リン酸化による細胞分裂制御」
- ・近藤久雄 「膜融合機構 p97/p47 経路の新規因子 VRF135 について」、第24回日本分子生物学会シンポジウム「細胞内メンブレントラフィック」