

細胞内小器官ゴルジ体の層板形成機構

「形とはたらき」領域 近藤 久雄

要 旨

細胞分裂期にはいると、ゴルジ体は小胞化し、娘細胞に分配される。そして娘細胞にて、小胞からゴルジ体に特徴的な積層層板構造が再形成される。この娘細胞におけるゴルジ体の再構成に必要な膜融合機構として、従来より、ATPaseであるp97とその補因子p47が必要であることを示し、そのゴルジ体における受容体としてsyntaxin5を同定してきた。この程さらに、このp97/p47経路の新規必須蛋白p135を見つけ、さらにこの因子が小胞体の網状構造形成にも必須であることを明らかにした。

1. 研究のねらい

イタリアの組織学者Camilo Golgi (1898)は、フクロウの小脳のプルキンエ細胞体の中に硝酸銀によって黒染する網状構造を発見した。その後、この構造物は種々の細胞に認められることがわかり、発見者の名前を冠してGolgi apparatus (ゴルジ体)と呼ばれるようになった。このゴルジ体の機能であるが、小胞体から送られた蛋白を受け取って修飾・選別して種々の目的地へ送り出す役割を果たしている。また、細胞内膜の細胞内循環の中心に位置しており、大変に動的な細胞内小器官でもあることが知られている。まさに細胞における蛋白や膜の集配送センターであり、細胞機能の根幹を司る細胞内小器官であるといえる。

その形態は、他の細胞内小器官と全く異なっており、大変に特徴的である。動物細胞のゴルジ体を光学顕微鏡レベルで見ると、核の近傍、中心体のあたりにリボン状の構造物として認められる。さらに電子顕微鏡で観察すると、直径1 μ m程の扁平な囊(cisterna)が、20-30nmの間隔で数枚積層した構造をとっていることが分かる。囊自身は中心部分が約10-20nmと薄いものの、縁の部分では約50-100nm程に拡張した形態を示している。さらに、この積層したゴルジ層板は極性を持っており、小胞体から分泌蛋白を受け取るシス側と、送り出すトランス側がある。

このような特徴的な構造がどのように形成され、維持されているのかという問題は、細胞の成り立ちや機能を考える上で大変に興味深い。近年になってゴルジ体を試験管内で分解し再構成する系が開発されたこともあって、この4、5年ほどの間に急速にこのゴルジ体形成

の分子機構が次第に明らかになりつつある。

動物細胞の細胞分裂の過程で小胞体やゴルジ体は小胞化するが、この小胞化は細胞内小器官の細胞分裂後の娘細胞への分配に重要と考えられている。特に、ゴルジ体の小胞化は劇的であり、細胞周期間期の1コピーのゴルジ体から細胞分裂期には数千の小胞や小管が生じ、それが広く細胞質全体に広がる(図1)。細胞周期の終期には、母細胞は二つの娘細胞に分裂するが、小胞化したゴルジ体は娘細胞に分配され、それぞれの娘細胞の細胞質でゴルジ体の重層層板構造が速やかに再構成される。この再構成機構の分子機構を検討することで、細胞間期におけるゴルジ体層板の形態ならびに形態維持機構に関する情報も併せて得られるであろうと期待し、私はこの娘細胞におけるゴルジ体再構成機構の解析を行っている。

ゴルジ体再構成にはゴルジ体膜の融合が必要であるが、そのためにはNSFとp97の二つのATPaseが必要である。NSFは10年以上も前に発見された古典的な膜融合蛋白であり、その経路については良く検討されている。一方、p97は比較的最近見つけられてこともあって、その経路についてはまだよく分かっていない。我々は今までに、その補因子p47を見つけ、膜上の受容体syntaxin5を見つけてきた。事業団の助成を受け、今度はさらに、このp97/p47/syntaxin5経路に必須の新規因子を見つけることが出来た。この因子は、ゴルジ体の形成のみならず、小胞体の形成にも必須であることがわかった。

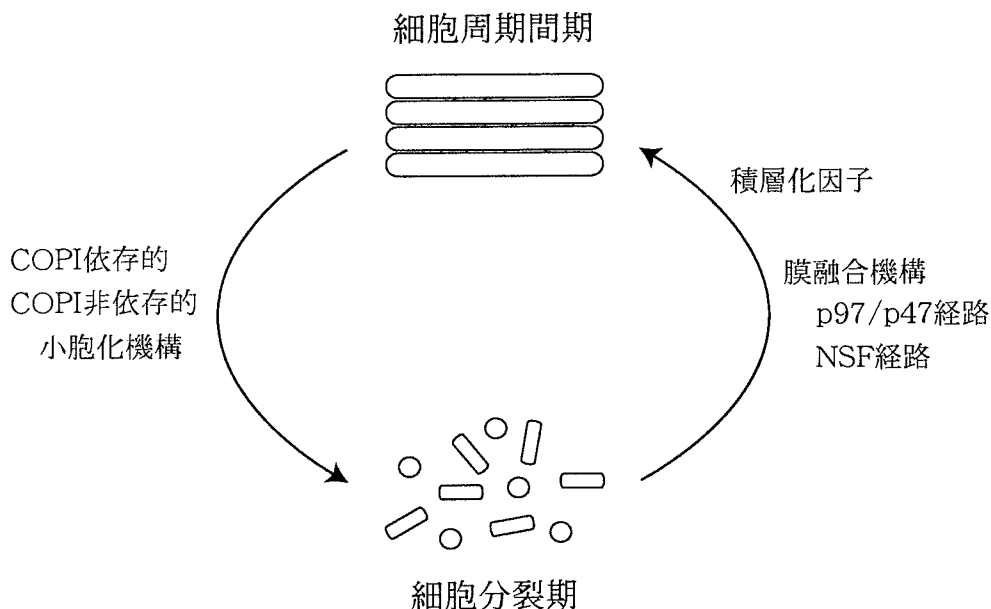


図1 ゴルジ体の細胞周期変化

2. 研究方法と成果

対向する膜上の SNARE とよばれる蛋白が活性化され、両方の膜上の SNARE 同士が結合することにより、対向する膜同士が近接状態に保たれ、そこで膜融合が起こると考えられている。その際に、SNARE の活性化を行うのが膜融合蛋白の機能である。

NSF 経路では、ATPase である NSF はその補因子 SNAP を介して、SNARE に結合する。NSF/SNAP/SNARE 複合体は ATP の加水分解に伴って解離し、その結果 SNARE は活性化される。一方、p97 経路では、ATPase である p97 はその補因子 p47 を介して、SNARE (syntaxin5) に結合する。しかしながら p97/p47/SNARE 複合体は ATP の加水分解に伴って解離しない。SNARE の活性化のためには複合体の解離は必要と考えられるので、何らかの因子がさらにここで必要になると予想された。そこで、これを同定・単離すべく試みた。

2-1 p135 の単離同定

まず始めに p97/p47 複合体の相互作用の解析を行った。様々な p47 の deletion mutants を作成し、p97 との結合性を調べた。その結果、p47 には二つの p97 結合領域が有ることを明らかにした。p97 の N 末端は、二つの globular なサブドメインをその間にある hinge サブドメインがつなぐ形をしているが、p47 の一つの p97 結合領域は p97 の一つの globular サブドメインに結合し、p47 のもう一つの p97 結合領域は p97 の二つの globular サブドメインを繋ぎ止めるように結合していた。これらのデータは、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を強く示している。

この p97/p47 複合体を解離するような因子があるとして、それがどのように p97/p47 複合体を解離するのかという作業仮説を図 2 A に示した。二つの相互作用で維持されている複合体は大変に強く結合していると考えられ、解離因子のターゲットになりにくいと考えられる。ただ、二つの相互作用のうちの一つが解離している状況が、例

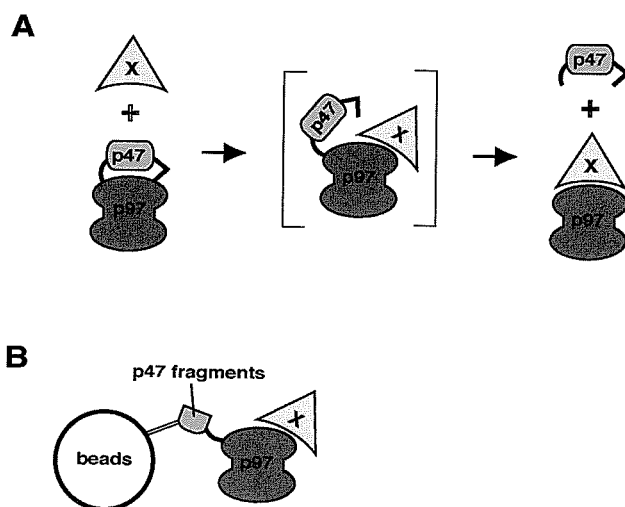


図 2 p97/p47 複合体解離因子の同定・単離

え不安定で一時的であろうと存在すると考えられるので、そのような遷移状態の複合体は解離因子の非常に良いターゲットになると考えられた。実際に、この仮説に基づいて、解離因子を同定・単離を試みた。遷移状態の p97/p47 複合体に解離因子が結合した状態は大変に不安定であると考えられるので、二つある p97 結合領域のうち一つのみを持つ p47fragments を作成し、これを用いてラット肝上清から解離因子の同定を行った (図 2 B)。その結果、分子量 135kDa の蛋白が得られ、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った。

2-2 p135 の生化学的解析

ラット肝上清を用いた免疫沈降反応や精製蛋白を用いた試験管内結合実験から p135 は p97 と結合することが明らかとなった。また、p135 は p47 と競合して p97/p47 複合体を解離するが、その解離様式は ATP 依存的であった。さらにクロスリンカーを用いた実験により p97/p47 複合体とも一時的な結合をすることが明らかとなり、p135 の p97/p47 複合体を解離する作用は単純な競合反応ではなく、p135 が p97/p47 複合体に結合して p135/p97/p47 の一時的複合体を形成した後、ATP の加水分解によって p135/p97 と p47 に解離すると考えられた。

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 p135 の受容体を検索した結果、それぞれ SNARE である syntaxin5 と syntaxin18 に結合していることを明らかに出来た。さらに興味深いことに、SNARE に結合した p135 は p97/p47/SNARE 複合体を ATP 加水分解依存的に解離することが分かった。正にこの p135 が、p97 経路における SNARE の活性化に必要な因子であった。また、種々の試験管内結合実験から、その解離機構は多段階からなる

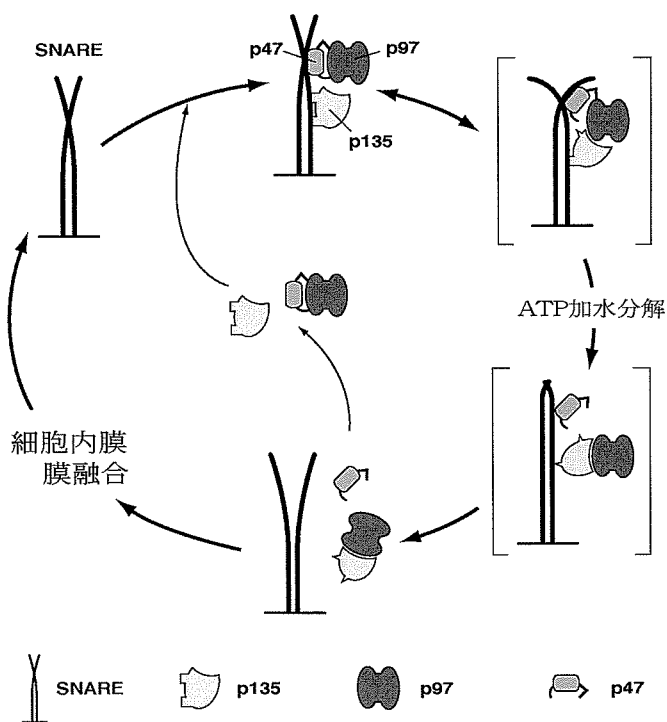


図 3 p135 による p97/p47/SNARE 複合体の解離機構

えられた (図3)。即ち、ATP加水分解により SNARE 上で p97 が p47 から p135 に転移し、それにより出来た p97/p135/SNARE 複合体が不安定になり、p97/p135 複合体が SNARE から離れることによると考えられる。

2-3 p135 の機能

ゴルジ体における p135 の機能を検討するために、単離したゴルジ体膜を用いた試験管内ゴルジ体再構成系を用いた。塩処理していないゴルジ膜の場合では p97/p47 複合体を加えただけでゴルジ膜の融合が見られたが、抗 p135 抗体はこれを阻害した。また、塩処理したゴルジ膜では p97/p47 複合体を加えただけではゴルジ膜の融合はみられなくなり、p97/p47 複合体に加えて p135 が必要であった。以上より、p97 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となった。

小胞体における p135 の機能の検討のためには以下の系を用いた。まず小胞体のマーカー蛋白 HSP47 に GFP-tag を付けた蛋白を安定的に発現する細胞を作成し、小胞体を可視化出来るようにした。その上で細胞膜を透過性にし、細胞分裂期・間期細胞質を加えて、小胞体網状構造の細胞周期依存的な形成を再現することに成功した。この系に抗 p135 抗体を加えたところ、小胞体網状構造の形成が完全に阻害された。同時に、この形成過程では p97/p47 経路が必要なことも明らかにしており、p135 は p97/p47 経路の因子として小胞体網状構造の形成にも必須であることがわかった。

以上から、p135 はゴルジ体・小胞体の形態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。

2-4 ゴルジ体・小胞体の細胞周期制御

細胞周期分裂期においてゴルジ体・小胞体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、事業団からの助成による膜融合機構 p97 経路に関する研究の過程で、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。その結果、リン酸化部位を変異させた p47 を加えることにより、細胞分裂期でもゴルジ体・小胞体の構造を保つことに世界に先駆けて成功した。これは試験管内での再構成実験ではあるが、現在、培養細胞にこの変異 p47 を発現させる系を確立しているところである。もしこれが成功すると、ゴルジ体・小胞体や核膜が細胞分裂期に何故その特徴的な構造を失い小胞化するのかという古くからの疑問に、直接的に答えることが出来ると考えて

いる。

3. 今後の展望

- (1) 細胞内の膜融合機構には二つの機構があるが、その内の大きな一方の柱である p97 経路の因子をさらに見つけていきたい。現在、p135 に加えてさらに別の p97 経路の新規因子と考えられる蛋白を同定しているので、それについて生化学的・機能的解析を加えていきたい。p97/p47 複合体・SNARE・p135 と現在まで明らかにされている p97 経路の因子は、全て自分が明らかにしてきたものなので、このまま p97 経路関連の因子は全部自分のところで見つけるつもりである。
- (2) p97/p47/p135 経路の細胞周期調節に関する仕事から、試験管内再構成系にて細胞分裂期でもゴルジ体や小胞体の構造を維持する変異を見つけることが出来た。現在、これを培養細胞の系で確立するようにトライしている。これが成功すれば、細胞分裂期に細胞小器官が小胞化しない系を、世界で初めて手にすることになる。これは、細胞分裂・細胞増殖の機構そのものに直接的に切り込む大きな武器になると考える。これを切り口にして、細胞増殖・癌化機構にも切り込んでいきたいと願っている。
- (3) 発生・分化過程においては、細胞の構造自体が大きく変化する。それは細胞内小器官の形成過程自体が、発生分化により大きく影響されることを意味しているが、現在までそのような研究は世界的に全くなされていない。そこで p97 経路を題材にして、発生・分化に伴う細胞内構造の形成機構の修飾メカニズムを明らかにしていきたい。

4. 発表リスト

4-1 論文

Uchiyama, K., Jokitalo, E., Kano, F., Zhang, X., Murata, M., Newman, R., Canas, B., Pappin, D., Freemont, P., and Kondo, H. VRF135, a novel essential factor for p97-mediated membrane fusion, recycles the p97/p47/SNARE complex. submitted to Cell

Kano, F., Kondo, H., Yamamoto, A., Uchiyama, K., Hosokawa, N., Nagata, K., and Murata, M. NSF/SNAPs and p97/p47/VRF135 are sequentially required for cell cycle-dependent reformation of the ER-network. submitted to Cell

Yuan, X., Shaw, A., Zhang, X., Kondo, H., Lally, J., Freemont, P. S., and Matthews, S. (2001). Solution structure and interaction surface of the C-terminal domain from p47: a major p97-cofactor involved in SNARE disassembly. J Mol Biol. in press

4-2 学会発表（シンポジウムのみ、○講演者）

- 近藤久雄、加納ふみ、村田昌之、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、内山圭司、Eija Jokitalo、加納ふみ、Xiaodong Zhang、村田昌之、Richard Newman、Benito Canas、Darryl Pappin、Paul Freemont、膜融合機構 p97/p47 経路の新規因子について、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」
- 加納ふみ、近藤久雄、細川暢子、永田和宏、村田昌之、セミインタクト細胞を用いた細胞周期依存的な ER ダイナミクスの再構成と解析、第54回日本細胞生物学会シンポジウム「シグナル分子のイメージング」
- Paul Freemont, Xiaodong Zhang, Anthony Shaw, Paul Bates, Richard Newman, Brent Gowen, Elena Orlova, Michael Gorman, Hisao Kondo, Pawel Dokurno, John Lally, Gordon Leonard, Hemmo Mayer, and Marin van Heel. Structure of the AAA ATPase p97, International Meeting, Cellular Functions of AAA proteins