

多機能アダプター蛋白質 GGA の細胞内小胞輸送における役割

(課題番号 15209002)

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (A))

研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 中山 和久  
(京都大学薬学研究科教授)

多機能アダプター蛋白質 GGA の細胞内小胞輸送における役割

(課題番号 15209002)

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (A))

研究成果報告書

平成 18 年 5 月

研究代表者 中山 和久  
(京都大学薬学研究科教授)

はしがき

小胞体で合成された分泌タンパク質や膜タンパク質は、ゴルジ体を経てトランスゴルジネットワーク (TGN) で選別され、最終目的地 (細胞膜, エンドソーム, リソソーム等) へ輸送される (図 1)。オルガネラ間のタンパク質輸送を仲介する輸送小胞は、低分子量 GTPase の ARF の制御下で積み荷タンパク質が集積することにより形成される。この際に、積み荷膜タンパク質の細胞質領域に存在する輸送シグナル (Tyrモチーフ, ジロイシンモチーフ等) がコートタンパク質により認識される。形成された輸送小胞は標的オルガネラ膜と融合し、積み荷タンパク質を受け渡す。TGN とエンドソーム/リソソーム間の輸送はクラスリンコート小胞が仲介する。さらに、積み荷タンパク質とクラスリンの結合を仲介する 4 種類のアダプタータンパク質 (AP) 複合体 (AP-1~AP-4) が存在し、それぞれ異なる輸送経路に関与する (図 1)。しかし TGN とエンドソーム/リソソームや細胞膜の間の輸送は複雑で、これら以外にも AP タンパク質が存在する可能性があった。近年、本研究代表者らは、新規の AP 様タンパク質ファミリー GGA (GGA1, GGA2, GGA3 ; GGA は Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ARF-binding protein の略) を同定した (図 2)。GGA はさまざまなタンパク質と相互作用することにより、マンノース 6 リン酸受容体 (M6PR),  $\beta$ -セクレターゼ等の積み荷タンパク質の TGN からエンドソームへの輸送を調節すると考えられる (図 2)。本研究では、GGA と相互作用する新たなタンパク質の同定、および種々のドミナント・ネガティブ変異体を用いた機能解析などにより、AP 複合体や GGA などのコートタンパク質による細胞内小胞輸送 (特に TGN とエンドソーム/リソソームの間の輸送) 調節機構の解析を行なった。その結果、以下のような研究成果をあげた。

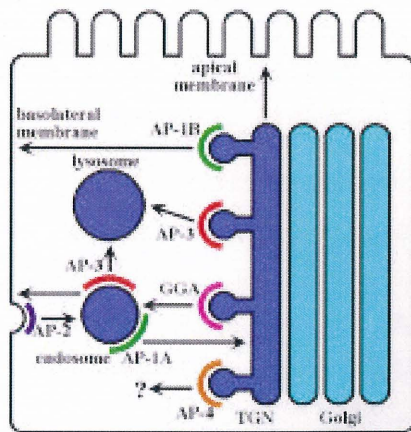


図1 アダプターおよびGGAの関与する細胞内輸送

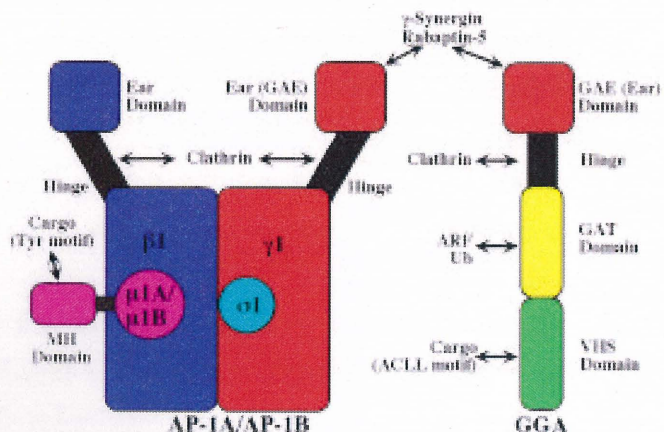


図2 AP-1アダプターおよびGGAの構造と相互作用するタンパク質

1. GGA の GAT ドメインに低分子量 GTPase の ARF が結合することを明らかにした。さらに、突然変異体を用いた解析から、ARF は GAT ドメインの N 末端側のサブドメイン (N-GAT サブドメイン) に結合す

る可能性を示した。

2. GGA1 の GAT ドメインと ARF の複合体の X 線結晶構造解析を行ない、GAT ドメインと ARF の結合様式を明らかにし、突然変異体を用いた解析と矛盾しないことを示した。
3. GGA の GAT ドメインにユビキチンが結合し、GGA 自体がユビキチン化されることを発見した。また、ユビキチンの結合が GGA のユビキチン化に必須であることを示した。
4. 突然変異体を用いた解析と X 線結晶構造解析のデータを考えあわせることにより、ユビキチンは GAT ドメインの C 末端側のサブドメイン (C-GAT サブドメイン) に結合する可能性を示した。
5. Tom1 や Tom1L1 の GAT ドメインにも、ユビキチンが結合することを証明した。
6. Tom1 の GAT ドメインには、別のユビキチン結合性タンパク質 Tollip が結合することを発見した。Tollip はエンドソームに局在し、そこに Tom1 をリクルートするとともに、ユビキチン化タンパク質もリクルートすることを証明した。これらの相互作用によりユビキチン化タンパク質の細胞内輸送やリソソームでの分解は複雑な調節を受ける可能性を示した。
7. GGA3-GAT ドメイン、および Tom1-GAT ドメインと Ub の複合体の X 線結晶構造解析を行ない、生化学的データおよび NMR による構造データと比較することにより、GAT ドメインには 2ヶ所の Ub 結合部位が存在することが明らかにした。この結合様式から、GAT ドメインによる Ub 化タンパク質の細胞内輸送やリソソームでの分解の調節に関するモデルを提唱した。

研究組織

研究代表者：中山 和久 (京都大学・薬学研究科・教授)

研究分担者：申 惠媛 (京都大学・薬学研究科・研究員 (科学研究))

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	18,200,000	5,460,000	23,660,000
平成 16 年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
平成 17 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

研究発表

(ア) 学会誌等

1. Katoh, Y., Imakagura, H., Futatsumori, M. & Nakayama, K.: Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341,143-149,2006
2. Akutsu, M., Kawasaki, M., Katoh, Y., Shiba, T., Yamaguchi, Y., Kato, R., Kato, K., Nakayama, K., & Wakatsuki, S.: Structural basis for recognition of ubiquitinated cargo by Tom1-GAT domain. *FEBS Lett.*, 579, 5385-5391,2005
3. Shin, H.-W., Kobayashi, H., Kitamura, M., Waguri, S., Suganuma, T., Uchiyama, Y. & Nakayama, K.: Roles of ARFRP1 (ADP-ribosylation factor-related protein 1) in post-Golgi membrane trafficking. *J. Cell Sci.*, 118, 4039-4048,2005
4. Kawasaki, M., Shiba, T., Shiba, Y., Yamaguchi, Y., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Kato, K., Nakayama, K. & Wakatsuki, S.: Molecular mechanism of ubiquitin recognition by GGA3 GAT domain. *Genes Cells*, 10, 639-654,2005
5. Matsuya, S., Sakagami, H., Tohgo, A., Owada, Y., Shin, H.-W., Takeshima, H., Nakayama, K., Kokubun, S. & Kondo, H.: Cellular and subcellular localization of EFA6C, a third member of the EFA6 family, in adult mouse Purkinje cells. *J. Neurochem.*, 93, 674-685,2005
6. Yoshimura, S., Yoshioka, K., Barr, F.A., Lowe, M., Nakayama, K., Ohkuma, S. & Nakamura, N.: Convergence of cell cycle regulation and growth factor signals on GRASP65. *J. Biol. Chem.*, 280, 23048-23056,2005
7. Shin, H.-W., Morinaga, N., Noda, M. & Nakayama, K.: BIG2, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-Ribosylation Factors: Its Localization to Recycling Endosomes and Implication in the Endosome Integrity. *Mol. Biol. Cell*, 15, 5283-5294.,2004
8. Kzhyshkowska, J., Gratchev, A., Martens, J.-H., Pervushina, O., Mamidi, S., Johansson, S., Schledzewski, K., Hansen, B., He, X., Tang, J., Nakayama, K., & Goerdt, S.: Stabilin-1 localises to endosomes and the trans-Golgi network in human macrophages and interacts with GGA adaptors. *J. Leukocyte Biol.*, 76, 1151-1161.,2004

9. Katoh, Y., Shiba, Y., Mitsuhashi, H., Yanagida, Y., Takatsu, H. & Nakayama, K.: Tollip and Tom1 form a Complex and recruit ubiquitin-conjugated proteins onto early endosomes. *J. Biol. Chem.*, 279, 24435-24443.,2004
10. Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Yoshino, K., Takatsu, H., Kobayashi, H., Shin, H.-W., Wakatsuki, S. & Nakayama, K.: GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. *J. Biol. Chem.*, 279, 7105-7111.,2004
11. Shakoori, A., Fujii, G, Yoshimura, S., Kitamura, M., Nakayama, K., Ito, T., Ohno, H. & Nakamura, N.: Identification of a five-pass transmembrane protein family localizing in the Golgi apparatus and the ER. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 312, 850-857,2003
12. Matsukawa, J., Nakayama, K., Nagao, T., Ichijo, H. & Urushidani, T.: Role of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) in gastric acid secretion. *J. Biol. Chem.*, 278, 36470-36475,2003
13. Wakasugi, M., Waguri, S., Kametaka, S., Tomiyama, Y., Kanamori, S., Shiba, Y., Nakayama, K. & Uchiyama, Y.: Predominant expression of the short form of GGA3 in human cell lines and tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 687-692,2003
14. Shiba, T., Kawasaki, M., Takatsu, H., Nogi, T., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Nakayama, K. & Wakatsuki, S.: Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport. *Nature Struct. Biol.*, 10, 386-393, 2003

(イ) 口頭発表

1. Nakayama, K., Shin, H.-W. & Ishizaki, R.: Regulation of membrane trafficking between the TGN and endosomes by ARF-GEFs. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Symposium "Regulating Membrane Traffic to Endosomes/Lysosomes". Kyoto, Japan, June, 2006
2. Nakayama, K., Shin, H.-W. & Ishizaki, R.: Regulation of membrane trafficking between the TGN and endosomes by ARF-GEFs. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Symposium "Regulating Membrane Traffic to Endosomes/Lysosomes". Kyoto, Japan, June, 2006

3. Ishizaki, R., Shin, H.-W., Iguchi-Ariga, S.M.M., Ariga, H. & Nakayama, K.: AMY-1 is localized on the trans-Golgi network in association with brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange factor 2 (BIG2). 第9回国際細胞膜研究フォーラム. 京都, 2006年3月
4. Koga, H., Shin, H.-W. & Nakayama, K.: Dual interaction of Arfophilins/Rab11-FIPs with ADP-ribosylation factor and Rab11. 第9回国際細胞膜研究フォーラム. 京都, 2006年3月
5. Katoh, Y., Yanagida, Y., Imakagura, H. & Nakayama, K.: Role of Tom1 family proteins in endosomal membrane traffic. 第9回国際細胞膜研究フォーラム. 京都, 2006年3月
6. Shin, H.-W., Kobayashi, H., Kitamura, M. & Nakayama, K.: Roles of ARFRP1 (ADP-Ribosylation Factor-Related Protein 1) in Post-Golgi Membrane Trafficking. 45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. San Francisco, December, 2005
7. Shin, H.-W., Kobayashi, H., Kitamura, M. & Nakayama, K.: Roles of ARFRP1 (ADP-Ribosylation Factor-Related Protein 1) in Post-Golgi Membrane Trafficking. 45th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. San Francisco, December, 2005
8. 中山和久, 芝陽子, 加藤洋平: タンパク質のコピキチン化とメンブレントラフィックの共役. 第28回日本分子生物学会年会シンポジウム. 福岡, 2005年12月
9. 申惠媛, 石崎玲, 中山和久: 細胞内膜輸送における BIG ファミリータンパク質 の機能. 第27回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 京都, 2005年11月
10. Shin, H.-W., Ishizaki, R. & Nakayama, K.: BIG2, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-Ribosylation Factors: Its Function at the Recycling Endosome. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 2005年10月
11. Mitsuhashi, H., Shin, H.-W., Zhang, Q., Kitamura, M. & Nakayama, K.: Characterization of Rab6 function in the post-Golgi trafficking using RNAi. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 2005年10月
12. Zhang, Q., Shin, H.-W. & Nakayama, K.: A New Method for Study of Post-Golgi Trafficking. 第78回日本生化学会大会. 神戸, 2005年10月



13. Ishizaki, R., Shin, H.-W., Iguchi-Arigo, S.M.M., Ariga, H. & Nakayama, K.: AMY-1 is localized on the trans-Golgi network in association with brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange factor 2 (BIG2). 第 78 回日本生化学会大会. 神戸、2005 年 10 月
14. Furuta, K., Ichikawa, A., Nakayama, K. & Tanaka, S.: Activation of histidine decarboxylase through post-translational cleavage of its aspartic acid residues in a mouse mastocytoma, P-815. 第 78 回日本生化学会大会. 神戸、2005 年 10 月
15. Kitamura, M., Shin, H.-W., Kobayashi, H., Waguri, S., Uchiyama, Y. & Nakayama, K.: Role of ARFRP1 (ADP-ribosylation factor-related protein 1) in post-Golgi membrane traffic. 第 58 回日本細胞生物学会大会、埼玉、2005 年 6 月
16. Koga, H., Shin, H.-W. & Nakayama, K.: Analyses of interaction of FIP3 and FIP4 with Rab11 and ARFs and their roles in membrane traffic. 第 58 回日本細胞生物学会大会、埼玉、2005 年 6 月
17. Katoh, Y., Imakagura, H. & Nakayama, K.: Tom1-Tollip complex regulates clathrin-mediated endosomal protein sorting. 第 58 回日本細胞生物学会大会、埼玉、2005 年 6 月
18. Yanagida, Y., Katoh, Y. & Nakayama, K.: Tom1L localizes to endosomes through interacting with TSG101. 第 58 回日本細胞生物学会大会、埼玉、2005 年 6 月
19. Nakayama, K.: GGAs: Traffic controllers at the TGN crossroads. International Symposium "Membrane Traffic". Kyoto, Japan, February, 2005
20. Nakayama, K.: GGAs: Traffic controllers at the TGN crossroads. International Symposium "Membrane Traffic". Kyoto, Japan, January, 2005
21. Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Wakatsuki, S. & Nakayama, K.: GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Washington DC, December, 2004
22. Nakayama, K. & Shin, H.-W.: BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its

- localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Washington DC, December, 2004
23. Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Wakatsuki, S. & Nakayama, K.: GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Washington DC, December, 2004
  24. Nakayama, K. & Shin, H.-W.: BIG2, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP-Ribosylation Factors: Its Localization to Recycling Endosomes and Implication in the Endosome Integrity. 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. Washington DC, December, 2004
  25. 阿久津誠人, 川崎政人, 志波智生, 加藤洋平, 加藤龍一, 中山和久, 若槻壮市: Tom1 GAT ドメインによるユビキチン認識の分子機構. 第 27 回日本分子生物学 会年会. 神戸, 2004 年 12 月
  26. Kawasaki, M., Shiba, T., Shiba, Y., Matsugaki, N., Igarashi, N., Suzuki, M., Kato, R., Nakayama, K. & Wakatsuki, S.: Molecular mechanism of ubiquitin recognition by GGA3 GAT domain. 第 77 回日本生化学会大会. 横浜, 2004 年 10 月
  27. 中山和久: GGA タンパク質: TGN-エンドソーム間の輸送を制御するクラスリン・アダプター. 公開シンポジウム「蛋白質分解: 新たなる展開をめざして». 札幌, 2004 年 9 月
  28. Shin, H.-W., Kobayashi, H. & Nakayama, K.: The subcellular localization and the role of ARF-related protein (ARF-RP). 第 57 回日本細胞生物学会大会, 大阪, 2004 年 5 月
  29. Shin, H.-W., Kobayashi, H. & Nakayama, K.: BIG2 function on the endosomal compartment. 第 57 回日本細胞生物学会大会. 大阪, 2004 年 5 月
  30. 中山和久, 芝 陽子, 加藤洋平, 志波智生, 高津宏之, 若槻壮市: アダプタータンパク質 GGA の構造と機能. 第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 金沢, 2003 年 11 月
  31. Popiel, H.A., Nagai, Y., Onodera, O., Inui, T., Fujitake, N., Fukui, K., Urade, Y., Ichikawa, A., Nakayama, K. & Toda, T.: Suppression of polyglutamine aggregation and cytotoxicity by the disruption of its toxic conformation via proline insertion. 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 2003 年 10 月

32. Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Wakatsuki, S. & Nakayama, K.: GAT domains of GGAs bind ubiquitin. 第76回日本生化学会大会、横浜、2003年10月
33. Katoh, Y., Shiba, Y., Takatsu, H. & Nakayama, K.: Tom1 interacts with ubiquitin and Tollip. 第76回日本生化学会大会、横浜、2003年10月
34. 中山和久, 芝 陽子, 加藤洋平, 高津宏之: GAT (GGA and Tom1) ドメイン: 新奇のユビキチン結合ドメイン. 第56回日本細胞生物学会大会、大津、2003年5月
35. Wakasugi, M., Waguri, S., Kametaka, S., Tomiyama, Y., Kanamori, S., Shiba, Y., Nakayama, K. & Yasuo Uchiyama: Predominant expression of the short form of GGA3 in human cell lines and tissues. 第56回日本細胞生物学会大会、大津、2003年5月

(ウ) 出版物

1. Nakayama, K. & Takatsu, H. (2005) Analysis of ARF interaction with GGAs in vitro and in vivo. In *Methods in Enzymology*, Vol. 404, GTPases regulating membrane dynamics (Balch, W.E., Der, C.J. & Hall, A., eds.) Elsevier, pp. 367-377.
2. Shin, H.-W., Shinotsuka, C. & Nakayama, K. (2005) Expression of BIG2 and analysis of its function in Mammalian Cells. In *Methods in Enzymology*, Vol. 404, GTPases regulating membrane dynamics (Balch, W.E., Der, C.J. & Hall, A., eds.) Elsevier, pp. 206-215.