



AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylates Golgi-Specific Brefeldin A Resistance Factor 1 at Thr1337 to induce disassembly of Golgi apparatus

宮本, 崇史

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4298

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004298>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	宮本 崇史
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1898 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylates Golgi-Specific Brefeldin A Resistance Factor 1 at Thr1337 to induce disassembly of Golgi apparatus(AMP-Activated Protein Kinase は Golgi-Specific Brefeldin A Resistance Factor 1 の Thr1337 のリン酸化を介してゴルジ体の拡散を誘導する)

審 査 委 員

主 査	教 授	中村 俊一
	教 授	春日 雅人
	教 授	廣明 秀一

要旨

Sufficiency and depletion of nutrients regulate the cellular activities through the protein phosphorylation reaction, however, many protein substrates remain to be clarified. Golgi-specific brefeldin A resistance factor 1 (GBF1), a guanine nucleotide exchange factor for the ADP-ribosylation factor family associated with the Golgi apparatus, was isolated as a phosphoprotein from the glucose-depleted cells by using the phospho-Akt-substrate antibody (PAS antibody), which recognizes the substrate proteins of several protein kinases. The phosphorylation of GBF1 was induced by 2-deoxyglucose (2-DG), which blocks glucose utilization and increases the intracellular AMP concentration, and by AICAR, an AMP-activated protein kinase (AMPK) activator. This phosphorylation was observed in the cells expressing the constitutively active AMPK. The 2-DG-induced phosphorylation of GBF1 was suppressed by Compound C, an AMPK-specific inhibitor, and by the overexpression of the kinase-negative AMPK. Analysis using the deletion and point mutants identified Thr1337 as the 2-DG induced phosphorylation site in GBF1, which is phosphorylated by AMPK *in vitro*. ATP depletion is known to provoke the Golgi apparatus disassembly. Immunofluorescent microscopic analysis with the Golgi markers indicated that GBF1 associates with the fragmented Golgi apparatus in the cells treated with 2-DG and AICAR. The expression of the kinase-negative AMPK and the GBF1 mutant replacing Thr1337 by Ala prevented the 2-DG-induced Golgi disassembly. These results indicate that GBF1 is a novel AMPK substrate, and that the AMPK-mediated phosphorylation of GBF1 at Thr1337 has a critical role, presumably by attenuating the function of GBF1, in the disassembly of the Golgi apparatus induced under stress conditions that lower the intracellular ATP concentration.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1895 号	氏 名	宮本崇史
論文題目 Title of Dissertation	AMP-activated protein kinase phosphorylates Golgi-specific Brefeldin A resistance factor 1 at Thr1337 to induce disassembly of Golgi apparatus AMP-activated protein kinase は Golgi-specific Brefeldin A resistance factor 1 の Thr1337 のリン酸化を介してゴルジ体の 拡散を誘導する		
審査委員 Examiner	主 査 中村 俊一 Chief Examiner 副 査 廣 明 秀一 Vice-examiner 副 査 春日 雅人 Vice-examiner		
審査終了日	平成 20 年 2 月 7 日		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

栄養物は生体内においてエネルギー源や構成材料として利用されるのみならず、細胞環境におけるその濃度変化はタンパク質リン酸化反応を介するシグナル伝達経路を介して細胞機能を調節しており、また近年、この栄養シグナル伝達経路の異常が様々な疾患に関係することが提唱され注目を集めている。ことにグルコースの濃度低下はAMP-activated protein kinase (AMPK)と呼ばれるプロテインキナーゼの活性亢進を誘導することが知られているが、栄養シグナルにより制御を受けるリン酸化基質タンパク質群については未だに十分な検討が行われていない。

本申請者は、リン酸化部位特異的抗体を用いた免疫沈降法と質量分析法を組み合わせることにより培養細胞から栄養状態に依存してリン酸化が変動するタンパク質の検索を実施し、グルコース欠乏によりリン酸化が亢進するタンパク質としてGBF1を同定した。GBF1は低分子量GTPaseであるARFのグアニンヌクレオチド交換因子であり、小胞体とゴルジ体の間においてARFを活性化し小胞形成を促進することによりゴルジ体の形態維持に関与することが報告されている。本研究では2-デオキシグルコース等のAMPK活性化誘導試薬およびAMPK特異的阻害剤の適用、ならびにAMPKの恒常的活性化型および活性欠失型の培養細胞への高発現により、細胞内においてGBF1がAMPKの下流でリン酸化を受けることが示された。また、GBF1が試験管内でAMPKによりリン酸化を受けることを示すとともに、GBF1の欠失変異体ならび点変異体を用いた解析により、その主要なリン酸化部位としてThr1337が同定された。さらにリン酸化Thr1337を含む合成ペプチドを抗原としてリン酸化残基特異的抗体を作製し、本抗体を用いたイムノブロット法により2-デオキシグルコース処理細胞においてGBF1のThr1337がリン酸化されることが確認された。一方、グル

コース欠乏といったAMPKの活性化が誘導される条件下ではゴルジ体の断片化、拡散が生じることが知られている。そこで、GBF1のリン酸化とゴルジ体の形態変化の関係を解析するため、GBF1のThr1337をAlaに置換した変異体を導入したところ、このリン酸化部位変異体の発現細胞では2-デオキシグルコース処理によるゴルジ体の断片化、拡散がほぼ完全に抑制されることが示された。以上の結果から、グルコース欠乏により誘導されるゴルジ体の形態変化がAMPKによるGBF1のリン酸化を介していることが明らかとなった。

本研究は、AMPKの新規基質タンパク質としてGBF1を見だしそのリン酸化部位を同定するとともにゴルジ体における役割について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったタンパク質リン酸化反応によるゴルジ体の形態制御について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。