

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07379

研究課題名(和文) Rab2の細胞内ターゲティング過程の再構成と分子機構解明

研究課題名(英文) Reconstitution of Rab2 targeting to ER-Golgi intermediate compartment in semi-intact cells

研究代表者

加納 ふみ (Kano, Fumi)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：10361594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rabファミリータンパク質の一つRab2のER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) 局在化メカニズム解明を目指し、細胞膜を透過性にしたセミインタクト細胞系を用いて、GFP標識Rab2リコンビナントタンパク質のERGICターゲティング再構成系を構築した。既知あるいは新規Rab2結合タンパク質群に対し本再構成系を用いて検証した結果、Rab2局在化制御因子を2つ同定した。これらの因子の一つは細胞質、もう一つは膜近傍でRab2と結合することがわかり、Rab2ターゲティングを協調的に制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セミインタクト細胞アッセイは細胞内構造の維持が必要不可欠なタンパク質の局在化研究に適した細胞側ツールであると言える。本研究で構築するアッセイは汎用性が高く、蛋白質の局在化と機能相関が重要である細胞生物学分野において学術的に意義がある。また、本申請研究で注目するRab2は、小胞輸送だけでなく、シグナル伝達、インスリン分泌・分解制御、オートファジーなどの細胞機能にも関与する。他にも自閉症スペクトラム障害や精神分裂病でRab2A点変異が報告されるなどRab2の生理機能の重要性はますます注目されており、その局在化機構解明はこれらの生命現象にも深く関わる重要なテーマである。

研究成果の概要(英文)：Rab2, a member of small GTPase protein family, specifically targeted to ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC). To reveal its regulatory mechanism, we reconstituted the targeting of GFP-tagged Rab2 recombinant protein to ERGIC in semi-intact HeLa cells, the plasma membrane of which was permeabilized with streptococcal pore forming toxin, streptolysin O. The targeting assay using the inhibitory antibodies revealed the involvement of two proteins, X and Y (the names of the proteins can not be open to the public since the paper relating to the results is now under submission), in the Rab2 targeting among the Rab2-interacting proteins. X was found interacting with Rab2 in cytoplasm and functioned for retaining the GTP-bound form of Rab2, while Y was bound to Rab2 near ERGIC membrane. These results suggested that Rab2 targeting to ERGIC was sequentially regulated by interacting with two distinct proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：再構成 オルガネラ タンパク質局在 Rab2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内にあるタンパク質は、各タンパク質に適した場所に局在することでその機能を最大限に発揮することができる。不適切な場所に配されたタンパク質は、相互作用すべきタンパク質・脂質・糖などと会合できず、適切な修飾などを受け得ない。よって、タンパク質の適切な局在化はすべてのタンパク質の機能に共通に関係する重要な生物学的課題である。タンパク質の局在化機構については、そのタンパク質自身が持つ局在化シグナル配列について盛んに研究されてきた。その一方で、アミノ酸配列に依存せず、エフェクター因子と相互作用し特定の場所に集積する機構も存在する。本研究で対象とする small GTPase ファミリーの一つ Rab タンパク質は後者の例の一つである。

Rab ファミリーは主に小胞輸送に関与する約 60 種類のタンパク質からなる巨大なファミリーの一つであり、GTP 結合ドメインと脂質修飾配列を共通に持つ。それぞれの Rab タンパク質はそのホモロジーの高さに関わらず異なるオルガネラに局在し、リクルートされたオルガネラでの小胞輸送過程などに機能する。Rab タンパク質の脂質修飾が膜へのリクルート・繫留に必要であることが報告されているが、それぞれの Rab タンパク質のオルガネラ特異性のメカニズムは各タンパク質のアミノ酸配列上にはなく、むしろ結合するエフェクターに依存すると考えられている。

本申請研究で注目する Rab2 は、ER-Golgi intermediate compartment(ERGIC)に局在し、COPI 小胞依存的輸送に関与する Rab ファミリータンパク質の一つである。Rab2 は近年小胞輸送以外の細胞機能にも関与することが報告されている。Luo らは Rab2A が MKP3 ホスファターゼによる Erk1/2 の不活性化を阻害することで Erk シグナル伝達を活性化すること、Rab2 発現が乳がんにおける致死率と高い相関にあることを報告している (Luo et al., Cell Rep., 2015)。また、我々は 2014 年に、インスリン分泌細胞 MIN6 細胞において Rab2 はインスリン分泌と分解の制御スイッチであることを見出した (Sugawara et al., Sci. Rep., 2014)。他にも自閉症スペクトラム障害や精神分裂病における Rab2A 点変異 (Takata et al., Neuron, 2016) が報告されるなど Rab2 の生理機能における重要性の高まりと相まって、Rab2 の ERGIC でのターゲティング・局在化機構解明はこれらの生命現象にも深く関わる重要な学術的テーマと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、Rab ファミリータンパク質の一つ Rab2 の ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC)局在化メカニズムを明らかにすることを目的とする。そのために、形質膜を透過性にしたセミインタクト細胞系を用いて、Rab2 タンパク質の ERGIC ターゲティングを再構成する。さらに、Rab2 結合タンパク質を抽出し、その中から Rab2 局在化に関与する因子を、構築した ERGIC ターゲティングアッセイを基に同定する。さらに、セミインタクト細胞・生細胞アッセイの両方のアプローチで、Rab2 局在化因子および Rab2 の ERGIC 局在化の生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

セミインタクト細胞とは、連鎖球菌毒素であるストレプトリシン O を形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞のことである (図 1)。ここに新たに外部より分画した細胞質を添加し、細胞質に依存的な細胞内のイベントを再構成し、その中で生起する生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる。申請者は今までに 20 種類を超える細胞アッセイ系を構築し、その成果を多くの査読付き国際誌に発表してきた (JCS 2009,

Genes to Cells 2005, 2005, MBC2004, 2000, JCB 2000 など)。セミインタクト細胞では形質膜が特異的に穿孔されているため、細胞内にあるオルガネラや細胞骨格の形態や配置はほぼインタクトに保たれていることが大きな特徴である。2015 年には、今回対象とする Rab2 と同じ Rab ファミリーに属する Rab6 のゴルジ体ターゲティングアッセイを構築し、Rab6 のゴルジ体局在に必要な因子として BICD2 を同定した

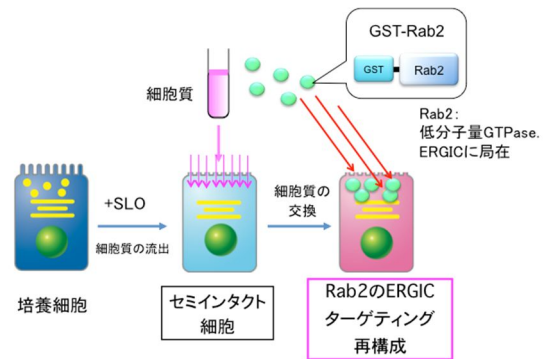


図1 セミインタクト細胞を用いた Rab2 ターゲティングアッセイ

(Matsuto et al., BBA, 2016)。本申請研究はまさにこのアッセイを基盤とし、応用したものである。具体的な研究項目は以下の通りである。

(1) Rab2 の ERGIC ターゲティングアッセイの構築：GFP 標識 Rab2 リコンビナントタンパク質 (GFP-Rab2) を細胞質や ATP 再生系とともにセミインタクト HeLa 細胞に添加しインキュベーションする。GFP-Rab2 タンパク質の局在化を可視化し、ERGIC ターゲティングアッセイを構築する。(2) Rab2 の ERGIC ターゲティング局在化因子の抽出：ターゲティングに必要な因子として Rab2 結合タンパク質に着目する。既存の Rab2 結合タンパク質だけでなく、質量分析により新規 GST-Rab2 結合タンパク質を同定し、候補タンパク質とする。(3) Rab2 の ERGIC ターゲティング局在化因子の同定：候補タンパク質を生化学的に除去・機能阻害した細胞質を用いた ERGIC ターゲティングアッセイ並びに RNAi などの生細胞アッセイにより、ERGIC ターゲティングに関わる Rab2 結合タンパク質を同定する。(4) Rab2 の ERGIC ターゲティングと細胞機能の関連の解明：Rab2 と同定された局在制御因子との相互作用について検証する。さらに局在制御因子に関して Rab2 が関わる細胞機能を検定することで、Rab2 の ERGIC ターゲティングの生理的意義を明らかにする。

4. 研究成果

研究項目に沿って、成果を記載する。

(1) Rab2 の ERGIC ターゲティングアッセイの構築：

大腸菌発現系を用いて Rab2 リコンビナントタンパク質を精製し、連鎖球菌毒素ストレプトリジン O 処理により形質膜に穴をあけたセミインタクト HeLa 細胞に添加することで ERGIC ターゲティングアッセイを構築した。まず GFP 標識 Rab2 タンパク質 (GFP-Rab2) を、キチン結合ドメインタンパク質とインテインの融合タンパク質として大腸菌に発現させ、キチンカラムへ吸着させたのち、インテインの自己切断能を利用してタグから遊離させ精製した。これによりタグのターゲティングへの影響を排除し、かつ GFP 標識タンパク質であるためその細胞内局在を抗体による染色なしで検出することが可能になった。精製した GFP-Rab2 をセミインタクト HeLa 細胞へ添加すると、細胞質非存在下でも ERGIC に局在し、細胞質は局在化を促進するものの必須ではないことがわかった。また GFP-Rab2 の ERGIC ターゲティングの時間依存性、GFP-Rab2 の濃度依存性を検証し、ターゲティングアッセイとして最適な条件を決定した。

(2) Rab2 の ERGIC ターゲティング局在化因子の抽出：

Rab2 の ERGIC ターゲティングは細胞質非依存的であったため、ターゲティング制御因子はセミインタクト細胞内にあることが予想された。そこで、セミインタクト細胞のライセー

トから GFP あるいは GFP-Rab2 に結合するタンパク質を免疫沈降法により回収した。SDS-PAGE 後 Ruby 染色を行い、GFP-Rab2 存在下で特異的に検出されるバンドを切り出し、質量分析を行った。その結果、2つの新規 Rab2 結合タンパク質が同定されたが、Rab2 との強い結合が検出されない、細胞内局在が ERGIC ではなくミトコンドリアである、などの結果が得られたため、Rab2 ターゲティング制御因子である可能性が低いと考えられた。

(3) Rab2 の ERGIC ターゲティング局在化因子の同定：

本課題で構築したセミインタクト細胞を用いた GFP-Rab2 タンパク質の ERGIC ターゲティングアッセイを用いて、既知の Rab2 結合タンパク質の関与を検証した。その結果、Rab2 結合タンパク質 X と Y (発表前であるため、名前を伏せる) に対する抗体をセミインタクト細胞に添加したところ、GFP-Rab2 の ERGIC ターゲティングが減少した。さらに、X あるいは Y の RNAi による発現抑制を行ったところ、内在性 Rab2 の ERGIC 局在が X では弱いながらも有意に、Y は顕著に減少させることがわかった。これらの結果は、X と Y はそれぞれ Rab2 の ERGIC ターゲティングの異なる過程を制御する可能性を示唆する。

(4) Rab2 の ERGIC ターゲティングと細胞機能の関連の解明：

X と Y の局在に着目したところ、X はほとんどが細胞質と若干 ERGIC 膜近傍に濃縮しており、Y はシスゴルジ体膜 (ほとんど ERGIC 膜と光学顕微鏡レベルでは同一に見えるゴルジ体膜領域) にあった。近接ライゲーションアッセイ (Proximity Ligation Assay) による Rab2 と X および Rab2 と Y の細胞内での近さを調べたところ、X は細胞質で、Y は ERGIC 膜近傍で Rab2 に近接することがわかった。さらに、近接する Rab2 と Y に起因する蛍光シグナルは X のノックダウンにより有意に少なくなることが明らかになった。よって、Y は Rab2 の膜へ強固に結合させ、Rab2 と X との細胞質結合はその過程を促進するというモデルが考えられる。先行研究から Rab2 の小胞輸送、ER ストレス依存的細胞死、オートファジーなどへの関与が示されていることから、現在これらのタンパク質群およびタンパク質間相互作用の当該生命現象への影響を検証し、それらの結果をまとめて論文化の準備をしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nakatsu, D., Kano, F., Shinozaki-Narikawa, N., Murata, M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Pyk2-dependent phosphorylation of LSR enhances localization of LSR and tricellulin at tricellular tight junctions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0223300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0223300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kunishige, R., Kano, F., Murata, M.	4. 巻 1864
2. 論文標題 The cell resealing technique for manipulating, visualizing, and elucidating molecular functions in living cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2019.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kano, F., Murata, M.	4. 巻 67
2. 論文標題 Semi-intact cell system for reconstituting and analyzing cellular Golgi dynamics.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Golgi Apparatus and Centriole	6. 最初と最後の頁 233-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-23173-6_10	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kano, F., Murata, M.	4. 巻 1866
2. 論文標題 Phosphatidylinositol-3-phosphate-mediated actin domain formation linked to DNA synthesis upon insulin treatment in rat hepatoma-derived H4IIEC3 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Cell Res.	6. 最初と最後の頁 793-805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara, F., Kano, F., Murata, M., Kimura, Y., Kioka, N., Ueda, K	4. 巻 9
2. 論文標題 Changes in the asymmetric distribution of cholesterol in the plasma membrane influence streptolysin O pore formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 4548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39973-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe-Takahashi, M., Yamasaki, S., Murata, M., Kano, F., Motoyama, J., Yamate, J., Omi, J., Sato, W., Ukai, H., Shimasaki, K., Ikegawa, M., Tamura-Nakano, M., Yanoshita, R., Nishino, Y., Miyazawa, A., Natori, Y., Toyama-Sorimachi, N., Nishikawa, N.	4. 巻 8
2. 論文標題 Exosome-associated Shiga toxin 2 is released from cells and causes severe toxicity in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 10776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29128-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 村田昌之、加納ふみ	4. 巻 90
2. 論文標題 「セミンタクト細胞リシール技術の新展開: 「再構成」から「細胞編集」まで」	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 433-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900433	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 國重 莉奈、加納 ふみ、村田 昌之	4. 巻 69
2. 論文標題 「セミンタクト細胞リシール技術を用いた細胞機能解析」	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 247-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425200804	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murakami Masataka, Kano Fumi, Murata Masayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 LLO-mediated Cell Resealing System for Analyzing Intracellular Activity of Membrane-impermeable Biopharmaceuticals of Mid-sized Molecular Weight	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20482-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaoki Yudai, Kiyoshi Ayaka, Miyake Masayuki, Kano Fumi, Murata Masayuki, Nagata Takashi, Katahira Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 The first successful observation of in-cell NMR signals of DNA and RNA in living human cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 2982 ~ 2985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CP05188C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kano Fumi, Noguchi Yoshiyuki, Murata Masayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Establishment and phenotyping of disease model cells created by cell-resealing technique	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-15443-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horiuchi Yuta, Nakatsu Daiki, Kano Fumi, Murata Masayuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Pyruvate kinase M1 interacts with A-Raf and inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by activating MEK1/ERK pathway in mouse insulinoma cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 212 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellsig.2017.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 加納ふみ、野口誉之、村田昌之	4. 巻 -
2. 論文標題 セミンタクト細胞リシール技術を用いた糖尿病モデル細胞アレイとその解析法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臓器チップの技術と開発動向 (監修: 酒井康行, 金森敏幸、シーエムシー出版)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村田昌之、加納ふみ	4. 巻 -
2. 論文標題 病態モデル細胞の創成と新展開 - 未来のナノメディシンに資する新しい細胞編集技術 -	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 キヤノン財団ライブラリー『ナノテクノロジーが拓く未来の医療』(片岡一則編著、丸善プラネット)	6. 最初と最後の頁 228-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Sonoda, Fumi Kano, Masayuki Murata	4. 巻 11
2. 論文標題 Applications of cell resealing to reconstitute microRNA loading to extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82452-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 村田昌之、加納ふみ	4. 巻 275
2. 論文標題 リシール細胞技術を用いた“細胞編集”	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 144-148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國重莉奈、園田雄輝、村上真隆、加納ふみ、村田昌之
2. 発表標題 セミンタクト細胞リシール技術を用いた細胞機能解析・評価系の開発
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津 大貴, 村田 昌之, 加納 ふみ
2. 発表標題 M型ビルビン酸産生酵素PKM1の減少は小胞体ストレス依存的な膜臓 細胞死を促進する
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会 第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Mitsubori, Kohki Okabe, Fumi Kano, Takashi Funatsu
2. 発表標題 細胞内温度変動に関与する分子のスクリーニング法の開発
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加納ふみ
2. 発表標題 リシール細胞技術を用いた疾患モデル細胞の構築とそのフェノタイプ解析
3. 学会等名 電気化学会第85回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumi Kano
2. 発表標題 Cell-based analytical method for manipulating and evaluating protein network
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関