

平成22年 5月25日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18209003

研究課題名（和文）低分子量 GTPase による細胞内小胞輸送とユビキチン化の調節

研究課題名（英文）Regulation of membrane traffic and ubiquitination by small GTPases

研究代表者

中山 和久（NAKAYAMA KAZUHISA）

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：40192679

研究成果の概要：タンパク質のユビキチン化は、プロテアソームによる分解シグナルであるだけでなく、近年では多様なタンパク質の細胞内小胞輸送（メンブレントラフィック）過程を調節することが明らかになってきた。また、ユビキチン化は細胞質分裂の調節においても重要な役割を果たすことがわかってきた。一方、小胞輸送の過程は Arf ファミリーや Rab ファミリーに属する多くの低分子量 GTPase による調節を受ける。本課題では、Arf や Rab と結合するとともに、ユビキチンとも直接、あるいは間接的に結合するタンパク質による細胞内小胞輸送と細胞質分裂の調節に関して、タンパク質間相互作用解析、細胞内局在解析、siRNA などによるノックダウン解析、タイムラプス解析などによって研究を行い、その調節の一端を解明した。

研究成果の概要（英文）：Ubiquitination serves as a signal for protein degradation by the proteasome as well as regulates various aspects of membrane trafficking. Furthermore, ubiquitination has been revealed to play a crucial role in cytokinesis. On the other hand, membrane trafficking is regulated by the Arf and Rab families of small GTPases. In this study, I have studied on regulation of membrane trafficking and cytokinesis by proteins that not only bind to the small GTPases but also undergo ubiquitination and/or ubiquitin binding, and identified a part of the regulatory mechanisms.

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2007年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2008年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
年度			
年度			
総計	37,500,000	11,250,000	48,750,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：小胞輸送、メンブレントラフィック、低分子量 GTPase、ユビキチン、細胞質分裂

1. 研究開始当初の背景

タンパク質がユビキチン化（特にポリユビキチン化）を受けることによって、プロテアソームで分解されることはよく知られてい

る。しかし最近、EGF 受容体や HGF 受容体をはじめとする種々の増殖因子受容体のダウン・レギュレーションの過程において、受容体がモノユビキチン化され、小胞輸送によ

り多胞エンドソーム (MVB) を経て最終的にリソソームにまで運ばれて分解されることが明らかになった。また、細胞間の接着が、E-カドヘリン複合体のユビキチン化とエンドサイトーシスにより調節されることも判明した。さらには、IL-1 受容体 (IL-1R) や自然免疫に関与する Toll 様受容体 (TLR) の下流のシグナル伝達の過程においても、タンパク質がユビキチン化されることにより応答が調節されている。これらの調節には、ユビキチン化タンパク質を認識して結合するさまざまなアダプタータンパク質が関与している。したがって、このユビキチン認識系に何らかの欠陥が生じれば、細胞増殖が異常になってがん化したり、細胞接着がうまく行かずに形態形成が異常になったり、免疫応答が異常になったりする。

本研究代表者らは、2000 年に、トランスゴルジネットワーク (TGN) からエンドソームへのタンパク質輸送に関与するクラスリン被覆小胞の新規のアダプタータンパク質 GGA を発見した。GGA は、その GAT (GGA and Tom1) ドメインを介して低分子量 GTPase の Arf と結合して TGN 膜上にリクルートされ、VHS ドメインを介して輸送されるべき積み荷タンパク質と結合し、ヒンジ領域を介してクラスリンと結合することにより、クラスリン被覆小胞のアダプターとして機能する。また 2004 年になって、申請者らは GGA が GAT ドメインを介してユビキチン化タンパク質と結合するとともに、GGA 自体がユビキチン化されることを発見した。この GAT ドメインのユビキチンへの結合は、活性型の ARF が GAT ドメインに結合すると増強される。このことは、GGA のユビキチン化タンパク質との結合は、低分子量 GTPase の Arf によるタンパク質の小胞輸送と共役する可能性を示唆する。一方、GAT ドメインには、Rabaptin-5

がユビキチンと競合的に結合する。

Rabaptin-5 は、別の低分子量 GTPase ファミリーの Rab5 や Rab4 のエフェクターであり、クラスリン被覆小胞と標的となるエンドソームの膜との融合を調節するタンパク質である。このことは、輸送される積み荷タンパク質のユビキチン化が、クラスリン被覆小胞のエンドソーム膜との融合を調節する可能性を示唆する。

また本研究代表者らは、GGA と構造的に類似している Tom1 ファミリータンパク質 (Tom1、Tom1L1、Tom1L2) に関しても次のことを明らかにした。①これらのタンパク質の GAT ドメインにもユビキチンが結合すること；②GAT ドメインが IL-1R や TLR の下流のシグナル伝達を負に調節するタンパク質 Tollip と結合すること；③C 末端領域を介してクラスリンと結合すること；④Tom1L1 は、ユビキチン化タンパク質を含む小胞が MVB 内へと陥入する際に必要な ESCRT 複合体のサブユニットの一つの Tsg101 と結合すること；⑤Tollip も C 末端の CUE ドメインを介してユビキチンと結合すること；⑥Tollip は C2 ドメインを介してエンドソームに局在すること；⑦Tollip や Tom1、Tom1L1 は様々な増殖因子の刺激に応答してチロシン・リン酸化されること。これらのことは、IL-1R などの下流のシグナル伝達が、増殖因子からのシグナルと共役して、ユビキチンによる修飾を介してエンドソーム/リソソーム系で調節される可能性を示唆する。

2. 研究の目的

本研究代表者らのこのようなデータによって、ユビキチン化は、プロテアソームでのタンパク質分解のシグナルであるだけでなく、細胞膜からエンドソームへのタンパク質の逆行輸送、TGN からエンドソームへの順行

輸送などのように、これまでに考えられていたよりもずっと多様な機能を果たすと考えられる。さらに、これらの過程は、Arf や Rab5、Rab4 などの低分子量 GTPase による厳密な調節を受ける可能性がある。本研究では、ユビキチンが果たすこれらの機能の間の共役（特に小胞輸送とタンパク質分解の関連）、およびこの共役における低分子量 GTPase の Arf や Rab の役割の解明をめざす。この共役機構を解明することによって、細胞増殖、細胞接着などの調節に関して、これまでにない観点からの知見が得られると考える。

3. 研究の方法

(1) Tom1 ファミリータンパク質とユビキチンや Tollip との相互作用を詳細に解析するとともに、ユビキチン化が関係する MVB の形成や細胞質分裂の調節、HIV-1 などのウイルスの出芽の調節における役割を探る。

(2) 細胞内小胞輸送に関与する低分子量 GTPase (Arf6 や Rab11)、およびそれらのエフェクタータンパク質 (Rab11-FIP3 や Rab11-FIP4、MKLP1) は、細胞質分裂の際にミッドボディー近傍に局在する。また、ユビキチン化タンパク質を認識したり調節したりするタンパク質 (Tsg101 など) もミッドボディー近傍に局在する。

そこで、上記のエフェクタータンパク質に関して、siRNA 法により発現抑制した培養細胞やドミナントネガティブ変異体を発現した細胞における小胞輸送の変化や細胞の形態、細胞分裂の変化などを観察することによって、それらの小胞輸送と細胞質分裂における機能の比較を行う。さらに、これらの低分子量 GTPase やエフェクターに関して、GFP や mCherry のような蛍光タンパク質との融合タンパク質の発現ベクターを作製して培養細胞内で発現させ、タイムラプス顕微鏡法に

より細胞分裂時におけるこれらのタンパク質の細胞内局在の経時変化を観察する。

4. 研究成果

(1) Tom1 ファミリーと Tollip に関して以下のことを明らかにした。

① Tollip がその C2 ドメインを介しておそらくは PI(3,4,5)P₃ を認識することによって、エンドソーム膜上に局在するようになること。

② Tom1 がその GAT ドメインを介して Tollip に結合して、サイトゾルからエンドソーム膜上へとリクルートされること。

③ Tom1 が GAT ドメインを介してユビキチン化タンパク質をエンドソーム膜上へとリクルートすること。

④ Tom1 はその C 端領域に存在するクラスリンボックス・モチーフを介してクラスリンと結合し、クラスリンをエンドソーム膜上へと間接的にリクルートすること。

⑤ Tom1L1 がその GAT ドメインを介してユビキチン化タンパク質と結合するとともに、ESCRT-I 複合体のサブユニットの一つである Tsg101 と結合すること。

⑥ Tom1L1 と Tsg101 は、分裂間期の細胞では後期エンドソームに局在するのに対して、細胞質分裂時には Tom1L1 は Tsg101 を介してミッドボディーにリクルートされること (図 1)。

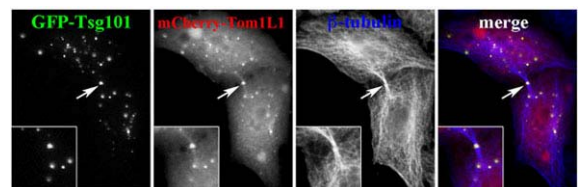


図1 細胞質分裂時のTsg101とTom1L1のミッドボディーへの局在

⑦ Tsg101 の Tom1L1 との結合と Tsg101 の HIV-1 Gag タンパク質の結合は競合すること。

以上の結果から、Tom1-Tollip 複合体が増殖因子受容体や Toll 様受容体の下流で機能して、クラスリンと共役するメンブレントラ

フィックを調節することにより、ユビキチン化タンパク質のエンドソームを経てリソソームでの分解を調節する可能性を示した。また、Tom1L1 は、ユビキチン化タンパク質を認識する Tsg101 と結合することによって、MVB 形成を調節するだけでなく、細胞質分裂の過程を調節する可能性を示した。

(2) 低分子量 GTPase やそれらのエフェクタータンパク質について

- ① FIP3 と FIP4 はリサイクリングエンドソームに局在し、Rab11 および Arf6 に結合する。siRNA 解析などによって、FIP3/FIP4 は分裂間期には Rab11 依存的にリサイクリングエンドソームに局在するのに対して、細胞質分裂時には Rab11 依存的にミッドボディーに局在することを明らかにした。さらに、免疫蛍光法やタイムラプス解析などによって、2つの娘細胞の間の切断時には、FIP3/FIP4 は Arf6 とミッドボディーマトリックスに共局在することが明らかにした。
- ② FIP3/FIP4 は、分裂しつつある細胞の中心体付近から、リサイクリングエンドソームとともにミッドボディーへとリクルートされることを見いだした。
- ③ Arf6 は、収縮環近傍から MKLP1 や Tsg101 が既に存在しているミッドボディーへと移行すること、この移行は MKLP1 との結合に依存することなどを明らかにした。また、Arf6 や MKLP1、Tsg101 を siRNA 法により発現抑制した細胞や Arf6 ノックアウトマウス由来の細胞では、二つの核や複数の核を持つ細胞の割合が顕著に増えることから、細胞質分裂の過程が阻害されていることを示した (図 2)。

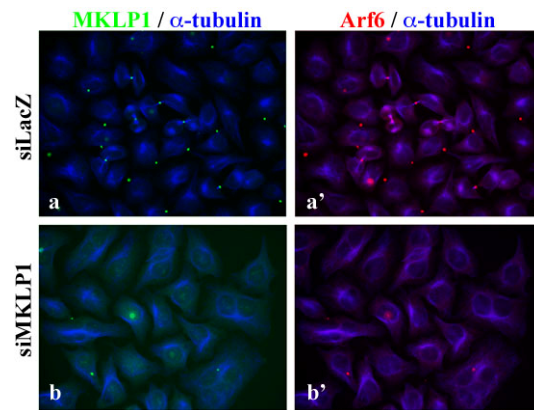


図 2 Arf6のMKLP1依存的なミッドボディーへの局在

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Saitoh, A., Shin, H.-W., Yamada, A., Waguri, S. & Nakayama, K. (2009) Three homologous ArfGAPs participate in coat protein I-mediated transport. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13948-13957. (査読有)
2. Nishimoto-Morita, K., Shin, H.-W., Mitsuhashi, H., Kitamura, M., Zhang, Q., Johannes, L. & Nakayama, K. (2009) Differential effects of depletion of ARL1 and ARFRP1 on membrane trafficking between the trans-Golgi network and endosomes. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10583-10592. (査読有)
3. Azuma, Y., Takada, M., Shin, H.-W., Kioka, N., Nakayama, K. & Ueda, K. (2009) The retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes Cells*, **14**, 191-204. (査読有)
4. Ishizaki, R., Shin, H.-W., Mitsuhashi, H. & Nakayama, K. (2008) Redundant roles of BIG2 and BIG1, guanine-nucleotide exchange factors for ARFs, in membrane traffic between the TGN and endosomes. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2650-2660. (査読有)
5. Yanagida-Ishizaki, Y., Takei, T., Ishizaki, R., Imakagura, H., Takahashi, S., Shin, H.-W.,

- Katoh, Y. & Nakayama, K. (2008) Recruitment of Tom1L1/Srcasm to endosomes and the midbody by Tsg101. *Cell Struct. Funct.*, **33**, 91-100. (査読有)
6. Yamane, J., Kubo, A., Nakayama, K., Yuba-Kubo, A. Katsuno, T., Tsukita, S. & Tsukita, S. (2007) Functional involvement of TMF/ARA160 in Rab6-dependent retrograde membrane traffic. *Exp. Cell Res.*, **313**, 3472-3485. (査読有)
7. Inoue, M., Shiba, T., Ihara, K., Yamada, Y., Hirano, S., Kamikubo, H., Kataoka, M., Kawasaki, M., Kato, R., Nakayama, K. & Wakatsuki, S. (2007) Molecular basis for autoregulatory interaction between GAE domain and hinge region of GGA1. *Traffic*, **8**, 904-913. (査読有)
8. Furuta, K., Nakayama, K., Sugimoto, Y., Ichikawa, A. & Tanaka, S. (2007) Activation of histidine decarboxylase through post-translational cleavage by caspase-9 in a mouse mastocytoma P-815. *J. Biol. Chem.*, **282**, 13438-13446. (査読有)
9. Shiba, T., Koga, H., Shin, H.-W., Kawasaki, M., Kato, R., Nakayama, K. & Wakatsuki, S. (2006) Structural basis for Rab11-dependent membrane recruitment of FIP3/Arfophilin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15416-15421. (査読有)
10. Yogosawa, S., Kawasaki, M., Wakatsuki, S., Kominami, E., Shiba, Y., Nakayama, K., Kohsaka, S. & Akazawa, C. (2006) Monoubiquitylation of GGA3 by hVPS18 regulates its ubiquitin-binding ability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 82-90. (査読有)
11. Furuta, K., Ichikawa, A., Nakayama, K. & Tanaka, S. (2006) Membrane orientation of the precursor 74-kDa form of L-histidine decarboxylase. *Inflamm. Res.*, **55**, 185-191. (査読有)
12. Ishizaki, R., Shin, H.-W., Iguchi-Ariga, S.M.M., Ariga, H. & Nakayama, K. (2006) AMY-1 (associate of Myc-1) localization to the trans-Golgi network through interacting with BIG2, a guanine-nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors. *Genes Cells*, **11**, 949-959. (査読有)
13. Katoh, Y., Imakagura, H., Futatsumori, M. & Nakayama, K. (2006) Recruitment of clathrin onto endosomes by the Tom1-Tollip complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **341**, 143-149. (査読有)
- [学会発表] (計 42 件)
1. 中山和久 (2010) CRESCent : 紡錘体極中心体のまわりに形成されるリサイクリングエンドソームのクラスター. 第 115 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム. 盛岡、3 月 28 日
2. Takatsu, H., Ueda, T., Waguri, S., Takahashi, S., Kondo, Y., Shin, H.-W. & Nakayama, K. (2009) CRESCent: Cluster of Recycling Endosomes Transiently Formed around Spindle Pole Centrosome. 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. San Diego, Dec. 7.
3. 中山和久, 高橋千絵, 武井朋美, 上田智子, 高津宏之, 申惠媛 (2009) Rab ファミリーと Arf ファミリーの低分子量 GTPase による細胞質分裂の調節. 第 82 回日本生化学会大会シンポジウム. 神戸、10 月 23 日
4. 高橋千絵, 武井朋美, 古賀裕士, 申惠媛, 中山和久 (2009) 分裂間期および細胞分裂時の FIP3/FIP4 の局在化における Rab11 および Arf6 の役割. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸、10 月 23 日
5. 上田智子, 武井朋美, 申惠媛, 阪上洋行,

- 中山和久 (2009) 細胞質分裂時の Arf6 および EFA6 (Arf6 GEF) の局在変化. 第 82 回日本生化学会大会. 神戸、10 月 23 日
6. 武井朋美, 高橋千絵, 申惠媛, 中山和久 (2009) 細胞質分裂における低分子量 GTPase Arf6 の機能の解析. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 名古屋、6 月 2 日
7. 高津宏之, 上田智子, 近藤由美香, 申惠媛, 中山和久 (2009) 細胞分裂時におけるリサイクリングエンドソームの動態. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 名古屋、6 月 2 日
8. 齋藤明奈, 申惠媛, 山田茜, 和栗聡, 中山和久 (2009) ArfGAP1,2,3 は COPI 被覆小胞を介する輸送経路で働く. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 名古屋、6 月 2 日
9. 満智秋, 申惠媛, 中山和久 (2009) メンブレントラフィックにおける Arfaptin/POR の機能研究. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 名古屋、6 月 2 日
10. 申惠媛, 近藤由美香, 中山和久 (2009) リソソーム分解経路における低分子量 GTPase ARF3 の機能. 第 61 回日本細胞生物学会大会. 名古屋、6 月 2 日
11. 中山和久 (2009) タンパク質の細胞膜への輸送とエンドサイトーシスの調節. 第 82 回日本薬理学会年会シンポジウム. 横浜、3 月 18 日
12. 中山和久, 高橋千絵, 武井朋美, 高津宏之, 申惠媛 (2008) 低分子量 GTPase によるリサイクリングエンドソーム機能と細胞質分裂の調節. BMB2008. 神戸、12 月 10 日
13. 高島皓平, 申惠媛, 中山和久 (2008) Arf のグアニンヌクレオチド交換因子 BIG1 と BIG2 のトランスゴルジ網への局在機構の解析. BMB2008. 神戸、12 月 12 日
14. 山本昆明, 申惠媛, 中山和久 (2008) 細

胞内小胞輸送における低分子量 GTPase Rab14 の役割. BMB2008. 神戸、12 月 12 日

15. Shin, H.-W., Nishimoto, K. & **Nakayama, K.** (2008) ARL1 and ARFRP1 independently regulate membrane trafficking 'to' and 'from' the TGN. The 2008 Golgi meeting. Pavia, Italy, Sep. 7.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/physchem/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 和久 (NAKAYAMA KAZUHISA)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号 : 40192679