

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2007～2010  
 課題番号：19209008  
 研究課題名（和文）細胞小胞輸送に関わる低分子量 GTP 結合蛋白の蛍光イメージングによる時空間的解析  
 研究課題名（英文）Spatio-temporal analysis of small GTPases involved in vesicular trafficking by fluorescence imaging  
 研究代表者  
 松田 道行（MATSUDA MICHUYUKI）  
 京都大学・生命科学研究科・教授  
 研究者番号：10199812

研究成果の概要（和文）：細胞小胞輸送は、細胞の生存に必須の過程を制御するのみならず、細胞内外の情報伝達においても重要な現象である。この細胞小胞輸送がどのように制御されているのかを明らかにするために、蛍光共鳴エネルギー移動の原理に基づくプローブを作成し、細胞小胞で低分子量 GTP 結合蛋白の活性が制御される様子を世界で初めて可視化した。さらに、これら低分子量 GTP 結合蛋白の活性制御に関わる分子を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Vesicular traffic regulates not only the process essential for cell survival but also intercellular and intracellular signaling. To elucidate the regulatory mechanism of vesicular traffic, we developed biosensors based on the principle of fluorescent resonance energy transfer, and succeeded for the first time to visualize the activity change of low-molecular weight GTPases on the vesicles. Furthermore, we identified molecules that regulate the activity of such low-molecular weight GTPases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,800,000 円	2,640,000 円	11,440,000 円
2008 年度	7,800,000 円	2,340,000 円	10,140,000 円
2009 年度	7,800,000 円	2,340,000 円	10,140,000 円
2010 年度	7,800,000 円	2,340,000 円	10,140,000 円
総計	32,200,000 円	9,660,000 円	41,860,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：FRET、G 蛋白、R-Ras、Rab5、Rac、Ral、アポトーシス、小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

細胞小胞輸送は、細胞外からの栄養分の取り込みや、新規に合成された脂質および膜結合蛋白質の細胞膜や細胞内小器官への輸送など細胞の生存に必須の過程を制御するのみならず、細胞表面受容体の発現量のコントロールや増殖因子の放出などを介して、細胞内外の情報伝達においても重要な現象である。遺伝学的あるいは生化学的解析により、

多くの分子群がこの細胞小胞輸送に関わっていることが明らかにされている。なかでも、Rab ファミリーや Arf ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白は、細胞小胞の目的地別の仕分けや目的地での細胞膜融合のタイミングを規定する重要な因子群である。最近、高度な蛍光顕微鏡技術を駆使した生細胞イメージングが、小胞輸送機構の解析に大きなブレークスルーを生み出しつつある。例えば、本邦

では東大の中野らが Golgi 体から小胞体への輸送機構を超高速度ビデオカメラを用いて可視化し、その機構に関わる長年の論争に決着をつけたり、海外では、Zerial らが、タイムラプスイメージングを用いて、小胞融合における Rab ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の役割を詳細に明らかにしたりしている。しかし、これまでの生細胞分子イメージング技術は、分子の局在を知ることはできても分子の活性化状態を知ることはできなかつた。特に低分子量 GTP 結合蛋白に関しては、細胞の構築を保ったままでその活性化状態を識別する適切な手段がなかったために、多くの小胞輸送に関わる低分子量 GTP 結合蛋白が、細胞内のいつどこで活性化されているかについては、さまざまな変異体を用いて得られる小胞の形態変化などから推察されているに過ぎなかつた。

## 2. 研究の目的

小胞内輸送における低分子量 GTP 結合蛋白群の On・Off 状態の制御機構、役割等について考察し、時空間制御機構の一般的原理を構築することである。具体的には下記の研究目的を設定した。

(1) Rab ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の活性変化のイメージング： 初期エンドソームに主として存在し、初期エンドソームと小胞の融合を制御している Rab5 を Rab ファミリーの代表として研究する。Rab5 の FRET プローブを作成し、これを用いて Rab5 が小胞輸送過程においてどういうタイミングで活性化されるかを可視化する。さらに、この Rab5 の活性変化とほかのどのような事象が相関するのかを明らかにし、Rab5 の機能に迫る。

(2) Arf ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の活性変化のイメージング： エキソサイトーシスに関与する Arf6 を Arf ファミリーの代表として研究する。Arf6 の FRET プローブを作成し、これを用いて Arf6 がエキソサイトーシスにおいてどういうタイミングで活性化されるかを可視化する。

(3) Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の小胞上における活性化のイメージング： われわれが小胞上に存在することを見出した R-Ras を Ras ファミリーの代表として研究する。FRET プローブを作成し、R-Ras が小胞輸送過程においてどういうタイミングで活性化されるかを可視化する。さらに、R-Ras に小胞上で結合する蛋白を同定し、R-Ras の小胞上での機能に迫る。

## 3. 研究の方法

(1) Rab ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の小胞輸送における活性化の可視化： Rab ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白 Rab5 の活

性をモニターする FRET プローブの開発した。このプローブを用いて、アポトーシス細胞が食食される過程での Rab5 活性化機構を解析した。

(2) Arf ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の小胞輸送における活性化の可視化： Arf6 の活性を可視化する FRET プローブの開発を試みた。

(3) Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白 R-Ras の活性をモニターするプローブの開発： R-Ras の活性を測定する FRET プローブを開発した。このプローブを用いて、R-Ras が小胞内で活性化される様子を可視化し、その機構をノックダウン実験等を用いた解析した。さらに、R-Ras に対する特異性の高い抗体を作成し、ついで、その抗体を用いて免疫電子顕微鏡写真を撮影することで、R-Ras の細胞内分布を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 初期エンドソーム上での Rab5 活性制御機構の解明： Rab5 に対する FRET バイオセンサーを作成した。このバイオセンサーはゲインが 90% 程度あり、今まで作成したバイオセンサーの中では極めてよいものであると評価された。このバイオセンサーを用いて、アポトーシス細胞食食過程における Rab5 の活性変化を可視化した。

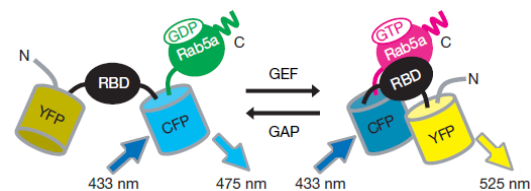
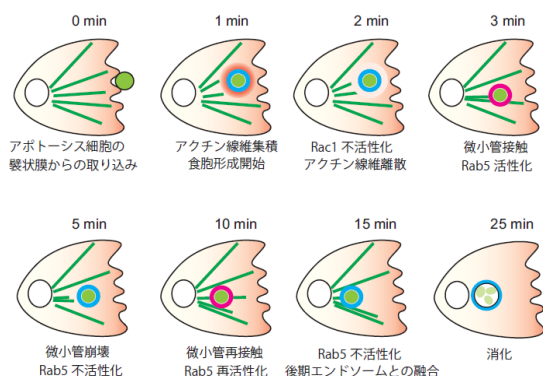


図1 Rab5 の FRET バイオセンサーの構造

さらに、Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク Rac1 についても同様の検討を行った。その結果、Rac1 活性の高い場所で、アポトーシス細胞の食食が起きること、アポトーシス細胞の細胞内への取り込み直後に、Rac1 の活性低下が起きること、この Rac1 活性の低下がファゴソーム周囲からのアクチン線維の離散に必要であることを見出した。さらに、Rab5 は、このアクチン線維の離散直後に活性化され、約 20 分続くことがわかった。この 20 分の間にファゴソーム内の pH の低下が観察された。Rab5 の活性化には、微小管が必要であった。その原因を調べたところ、微小管上に Rab5 活性化を司る Gapex5 というグアニンヌクレオチド交換因子が EB1 分子を介して、結合していることが判明した。以上の結果は、アポトーシス細胞の食食というプロセスにおいて、低分子量 GTP

結合タンパクがどのようにして時空間的に制御されているかを明らかにしたものである。下記には、このモデルを示している。



(2) Arf ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の活性変化のイメージング: Arf6 および Arf1 の FRET バイオセンサーの作成を試みた。プロトタイプ FRET バイオセンサーは作製し、活性化型および不活性化型における FRET 値の変化は観察できたが、Arf の活性の変化に伴う、細胞内局在の移動のため、活性変化と局在の変化とを明確に区別することができなかった。

(3) Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の一つ R-Ras の FRET プローブを作成し、R-Ras の機能を解析した。R-Ras 蛋白に対する良い抗体がなかったのでまず抗体を作成した。この抗体を用いて組織内分布および細胞内分布を調べた。R-Ras は平滑筋にもっとも多く発現しており、次いで、副腎髄質および膵臓ランゲルハンス氏島に多く発現していた。細胞内では、初期およびリサイクリングエンドソーム上に存在していた。このことは R-Ras が細胞外分泌に関与することを示唆する結果である。さらに FRET プローブで R-Ras の活性を調べたところ、エンドソーム上で活性が強いことがわかった。エンドソームにおいては RalA の活性も高いことを我々は報告している。そこで、R-Ras に結合する RalA 活性化因子を調べたところ、このエンドソーム上で R-Ras が RalA 活性化因子である Rgl2/Rlf と結合していることを見出した。RNAi により R-Ras の量を減らすと、RalA の活性が低下したことから R-Ras が RalA のエンドソーム上での活性化を制御していることが明らかとなった。さらに、PC12 細胞および下垂体細胞を用いて細胞外分泌における R-Ras および RalA の影響を解析し、R-Ras-RalA 経路がホルモン分泌に関与するという結果を得た。

##### 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 18 件) すべて査読有

1. Aoki K, Komatsu N, Hirata E, Kamioka Y, Matsuda M (2011) Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research. *Cancer Sci* 103: 614-619
2. Goto A, Hoshino M, Matsuda M, Nakamura T (2011) Phosphorylation of STEF/Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyryl cAMP-treated PC12D cells. *Mol. Biol Cell* 22: 1780-1790
3. Parrini MC, Sadou-Dubourgoux A, Aoki K, Kunida K, Biondini M, Hatzoglou A, Poulet P, Formstecher E, Yeaman C, Matsuda M, Rosse C, Camonis J (2011) SH3BP1, an exocyst-associated RhoGAP, inactivates Rac1 at the front to drive cell motility. *Mol. Cell* 42: 650-661
4. Kiyokawa E, Aoki K, Nakamura T, Matsuda M (2010) Spatiotemporal regulation of small GTPases as revealed by probes based on the principle of Foerster resonance energy transfer (FRET): Implications for signaling and pharmacology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51: 337-358
5. Aoki K, Matsuda M (2009) Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nature Protoc* 4: 1623-1631
6. Elfenbein A, Rhodes JM, Meller J, Schwartz MA, Matsuda M, Simons M (2009) Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4-synectin.RhoGDI1 complex and is reversed by PKC $\alpha$  in a Rac1 activation pathway. *J. Cell Biol.* 186: 75-83
7. Lu A, Tebar F, Alvarez-Moya B, Lopez-Alcala C, Calvo M, Enrich C, Agell N, Nakamura T, Matsuda M, Bachs O (2009) A clathrin-dependent pathway leads to KRas signaling on late endosomes en route to lysosomes. *J. Cell Biol.* 184: 863-879
8. Nakamura T, Matsuda M (2009) In vivo imaging of signal transduction cascades with probes based on Forster Resonance Energy Transfer (FRET). *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 14: Unit 14.10
9. Tachibana M, Kiyokawa E, Hara S, Iemura SI, Natsume T, Manabe T, Matsuda M (2009) Ankyrin repeat domain 28 (ANKRD28), a novel binding partner of

DOCK180, promotes cell migration by regulating focal adhesion formation. *Exp. Cell Res.* 315: 863-876

10. Aoki K, Kiyokawa E, Nakamura T, Matsuda M (2008) Visualization of growth signal transduction cascades in living cells with genetically encoded probes based on Forster resonance energy transfer. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 363: 2143-2151
11. Hara S, Kiyokawa E, Iemura SI, Natsume T, Wassmer T, Cullen PJ, Hiai H, Matsuda M (2008) The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent mannose 6-phosphate receptor transport. *Mol. Biol. Cell* 19: 3823-3835
12. Itoh RE, Kiyokawa E, Aoki K, Nishioka T, Akiyama T, Matsuda M (2008) Phosphorylation and activation of the Rac1 and Cdc42 GEF Asef in A431 cells stimulated by EGF. *J. Cell Sci.* 121: 2635-2642
13. Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, Nagata S, Matsuda M (2008) Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453: 241-245
14. Nakamura T, Aoki K, Matsuda M (2008) FRET imaging and in silico simulation: analysis of the signaling network of nerve growth factor-induced neuritegenesis. *Brain Cell Biol.* 36: 19-30
15. Nakaya M, Kitano M, Matsuda M, Nagata S (2008) Spatiotemporal regulation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells A1 - Nakaya, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 9198-9203
16. Nishioka T, Aoki K, Hikake K, Yoshizaki H, Kiyokawa E, Matsuda M (2008) Rapid turnover rate of phosphoinositides at the front of migrating MDCK cells. *Mol. Biol. Cell* 19: 4213-4223
17. Takaya A, Kamio A, Masuda M, Mochizuki N, Sawa H, Sato M, Nagashima K, Mizutani A, Matsuno A, Kiyokawa E, Matsuda M (2007) R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol. Biol. Cell* 18: 1850-1860
18. Yoshizaki H, Mochizuki N, Gotoh Y, Matsuda M (2007) Akt-PDK1 complex mediates EGF-induced membrane

protrusion through Ral activation. *Mol. Biol. Cell* 18: 119-128

[学会発表] (計 18 件)

1. 国田勝行、青木一洋、松田道行：FRET イメージングと統計的信号解析に基づく自発的な細胞遊走を制御する分子ネットワークの解析 第 83 回 日本生化学会大会 神戸 2010 年 12 月 7 日
2. Kazuhiro Aoki, and Michiyuki Matsuda : Quantitative kinetic analysis revealed processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 82 回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2010 年 12 月 7-10 日 (口頭発表)
3. 西岡照子、Michael A. Frohman、清川悦子、松田道行：Monitoring of phosphatidic acid distribution in the living cells by FRET probes 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2010 年 12 月 7-10 日
4. 八木俊輔、松田道行、清川悦子、管腔構造形成過程における信号伝達分子の FRET による可視化、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2010 年 10 月 22 日
5. 後藤明弘、中村岳史、星野幹雄、松田道行：PC12D 細胞における、dbcAMP 及び NGF によって誘導される神経突起生成のシグナル伝達経路の FRET を用いた解析 Neuro 2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会) 神戸 2010 年 9 月 3 日
6. 熊谷悠香、清川悦子、松田道行：Development of FRET probes for two-photon excitation microscopy 第 62 回日本細胞生物学会大会 大阪 2010 年 5 月 19 日
7. 西岡照子、清川悦子、松田道行：FRET プロブを用いたホスファチジン酸のモニタリング 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜 2009 年 12 月 9-12 日
8. 吉木さや香、青木一洋、清川悦子、松田道行：Ras とカルシウムのシグナルは、Raf1 において Shoc2 を介して合流する 第 82 回日本生化学会大会 神戸 平成 21 年 10 月 21 日～10 月 24 日
9. 熊谷悠香、清川悦子、松田道行：二光子レーザー顕微鏡用のホスファチジルイノシトールリン脂質に対する FRET バイオセンサーの開発 第 82 回日本生化学会大会 神戸 平成 21 年 10 月 21 日～10 月 24 日
10. 八木俊輔、清川悦子、松田道行：管腔構造形成過程における信号伝達分子の

FRET による可視化 第 82 回日本生化学会大会 神戸 平成 21 年 10 月 21 日～10 月 24 日

11. 八木俊輔、清川悦子、松田道行：MDCK 細胞の管腔形成における Rho ファミリー G 蛋白質の FRET イメージング 第 61 回細胞生物学会 名古屋 平成 21 年 6 月 2 日～6 月 4 日

12. 八木俊輔、清川悦子、松田道行：管腔形成過程における Rho ファミリー G 蛋白質の FRET イメージング 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2008 年 12 月 9 日～12 月 12 日

13. Syunsuke Yagi, Etsuko Kiyokawa, Michiyuki Matsuda: FRET Imaging of Rho family GTPase activity during cyst and tubule formation. 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2008 年 12 月 9 日～12 月 12 日

14. Masahiro Kitano, Michio Nakaya, Takeshi Nakamura, Shigekazu Nagata and Michiyuki Matsuda; Development of the FRET-Based Probe for Monitoring Rab5 Activity in Living Cells: The first iCeMS International Symposium- The 11th International Membrane Research Forum; February 20-22, 2008: Hotel Fujita Kyoto, Kyoto

15. 橋充弘、清川悦子、真鍋俊明、松田道行：アンキリンリピートドメイン 28(ANKRD28)[新規 DOCK180 結合因子]は細胞遊走を制御する 第 66 回日本癌学会総会 横浜 2007 年 10 月 3 日-5 日

16. 原重雄、清川悦子、橋充弘、松田道行 DOCK180 regulates cation-independent mannose-6-phosphate receptor transport through SNX5 interaction 第 66 回日本癌学会総会 横浜 2007 年 10 月 3 日-5 日

17. 高谷昭行、神尾恭弘、増田道隆、望月直樹、澤洋文、佐藤まみ、長嶋和郎、水谷あきこ、松野あきら、清川悦子、松田道行：R-Ras は、Rgl2/Rlf を介して RalA をエンドソーム上で活性化し、エクソサイトーシスを制御する 第 40 回日本発生生物学会、第 59 回日本細胞生物学会合同大会 福岡 2007 年 5 月 28 日-30 日

18. Masahiro Kitano, Takeshi Nakamura, Michiyuki Matsuda: Development of the FRET-Based Probe for Monitoring Rab5 Activity in Living Cells; The 10th Membrane Research Forum; February 27-March 1, 2007 Hotel Fujita Kyoto, Kyoto

[その他]

ホームページ等

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fret/phogemon/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 道行 (MICHYUKI MATSUSA)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：10199812

### (2) 研究分担者

中村 岳史 (TAKESHI NAKAMURA)

東京理科大学・教授

研究者番号：60362604

(H19～H21)

清川 悦子 (ETSUKO KIYOKAWA)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：80300929