

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19570186

研究課題名 (和文) エンドサイトーシス経路を制御する多細胞特異的 Rab 蛋白質の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of Rab proteins involved in endocytic transport in multicellular organism.

研究代表者

安藤 恵子 (ANDO KEIKO)

埼玉大学・総合研究機構脳科学融合研究センター・特任准教授

研究者番号：40221741

研究成果の概要 (和文)：低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリーは小胞輸送を制御する主要な因子であり、その異常は遺伝的疾患の原因となることが知られている。ヒトでは 60 以上の Rab 分子種が同定されているが、生理機能は不明なものが多い。エンドサイトーシス経路における Rab の役割を明らかにするため、Rab および Rab と協調的に働く因子の線虫遺伝子の欠失変異体を作成した。これらの変異株を用いてエンドサイトーシスアッセイを体系的に行い、多細胞系におけるエンドサイトーシス経路に関与する分子群を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

A small G protein, Rab, is a major protein family which controls membrane traffic in eucaryotes. There are more than 60 members of Rab in the human genome, however, the biological functions of these proteins are not well understood. To clarify the physiological roles of Rab proteins in the endocytic transport, we isolated deletion mutants of genes encoding Rabs and their cooperating proteins in *C. elegans*. We systematically performed endocytosis assays using these mutations and identified proteins involved in endocytic transport in the multicellular organism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：小胞輸送・線虫・エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) エンドサイトーシスは真核細胞の生

存・維持など生命の基本的活動に必須なだけでなく、食作用による病原微生物の排除や、細胞膜レセプターの取り込みによるシグナルのダウンレギュレーションなど、高次生命機能においても重要な役割を果たしており、その破綻はさまざまな疾患を引き起こすことが知られている。低分子量Gタンパク質Rabファミリーは、小胞輸送を制御する主要な因子である。Rab分子種数は多細胞系で飛躍的に増大しており、ヒトでは60種以上が見い出されているが、その生理機能は不明なものが多い。

(2) エンドサイトーシス経路には14個のRab分子種が関与することが示唆されている(Mary-Pat S. *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev* 2003)。しかし、詳細な機能解析が進んでいる分子種はRab5やRab7などの一部の分子種であり、エンドサイトーシス経路におけるRabの役割とRabが介在する膜融合過程の分子メカニズムはまだよくわかっていない。

(3) 線虫は1000細胞から構成されるシンプルな多細胞動物で、遺伝学的解析に大変適している。線虫Rab分子種はヒトの約半数(29遺伝子)であり、Rabの体系的な解析が行ないやすいと考えられる。

2. 研究の目的

エンドサイトーシス経路におけるRab分子の役割を明らかにするため、線虫*C. elegans*をモデル動物として用い、Rab遺伝子の欠失変異体分離と機能解析を行う。また、Rabのシグナル伝達において協調的に働く因子の異常がRabの異常と同じ表現型(病態)をもたらすことが知られていることから、Rab分子だけではなく、相互作用分子についても遺伝学および生化学的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 欠失変異体の分離: TMP(トリメチルソラレン)/UV法で線虫ゲノムにランダムに欠失変異を導入した変異体バンクを作成し、線虫Rab遺伝子のエクソン部分を含むプライマーセットを用いて欠失変異のPCRスクリーニングを行った(Gengyo-Ando K & Mitani S, *BBRC* 2000)。ホモ接合体を分離し、野生型線虫と数回交配して2次的変異を取り除いた。ホモ接合体で維持できない株の場合には、適当な遺伝的バランスと交配して株化を行った。

(2) Rab遺伝子の発現解析: Rab遺伝子のプロモーター領域あるいは遺伝子の全長領域を蛍光タンパク質遺伝子に融合したコンストラクトを作成し、線虫の生殖腺にマイクロイ

ンジェクションしてトランスジェニックラインを作成した。これらのラインを用いて、発現細胞および細胞内局在を同定した。

(3) 変異体の表現型解析: Rab遺伝子の発現時期および発現細胞に着目してノックアウト変異体の表現型解析を行った。表現型解析に用いたエンドサイトーシスアッセイは以下の通りである。

① 蛍光タンパク質でラベルした卵黄タンパク質の卵母細胞への取り込み (receptor mediated endocytosis)

② 体腔細胞による偽体腔内のGFPの取り込み (pinocytosis)

③ 腸のアピカル側からの蛍光デキストランの取り込み

欠失変異体と上記①または②のトランスジェニックレポーターラインを交配し、変異体のバックグラウンドでアッセイを行い、エンドサイトーシス異常を解析した。③については、変異体に蛍光デキストランを固形培地に加え、口腔から取り込ませた。

(4) Rab相互作用分子の生化学的解析: 共免疫沈降法および yeast two hybrid アッセイ法を用いてRabとRabエフェクターの相互作用、およびRabエフェクターとSec1/Munc18 (SM) タンパク質の相互作用を解析した。

(5) オルガネラの解析: エンドソーム、リソソームを特異的に可視化するトランスジェニックレポーターラインを変異体と交配し、変異体細胞におけるオルガネラを可視化し解析した。

4. 研究成果

(1) エンドサイトーシス経路に関与することが示唆されている *rab-5*, *rab-7*, *rab-11*, *rab-14*, *rab-35*, *rab-39* について研究方法(1)の方法で欠失変異体を作成し、株化した。ホモ接合体で生存可能な変異体について、研究方法(3)の方法で体系的なエンドサイトーシスアッセイを行い、*rab-35*変異体において顕著なエンドサイトーシス異常が見い出された。*rab-5* および *rab-7* についてはRNAi法によるノックダウンを行い、*rab-5* RNAi 線虫で顕著なエンドサイトーシス異常が見い出された。それ以外の遺伝子についてはエンドサイトーシス異常は見い出されなかった。

(2) RabファミリーはSec1/Munc18ファミリーと遺伝学的に相互作用することが報告さ

れている。そこで、エンドサイトーシス経路で働く Sec1/Munc18 タンパク質を同定するため、研究方法(1)の方法で6つの Sec1/Munc18 遺伝子について欠失変異体を分離した。研究方法(3)に従って、体系的なエンドサイトーシスアッセイを行い、*vps-45* が顕著なエンドサイトーシス異常を示すことを見出した。

(3) ヒト VPS45 は Rab5 エフェクターの一つである Rabenosyn5 と特異的に結合することが報告されている。そこで、線虫 Rabenosyn5 ホモログ (*rabs-5*) の cDNA をクローニングし、研究方法(4)で VPS-45 との相互作用を検討した。その結果、VPS-45 は RAB-5 エフェクターである EEA1 とは結合しないが、RABS-5 と特異的に結合することが明らかになった。また、*rabs-5* が GTP 結合型 *rab-5* と特異的に結合することも確認された。

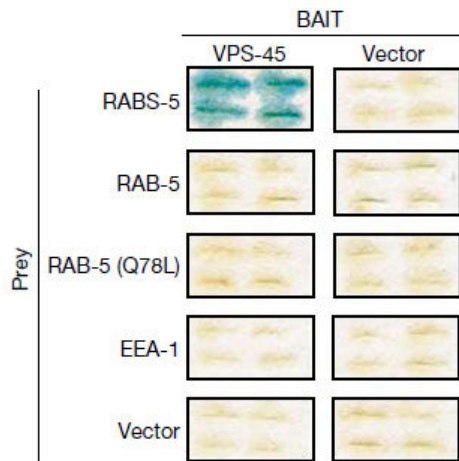


図1 : yeast two hybrid assay による rabenosyn5 と Sec1/Munc18 タンパク質との結合

(4) *rabs-5* がエンドサイトーシス経路で機能しているのかどうかを明らかにするため、*rabs-5* の欠失変異体を分離した。

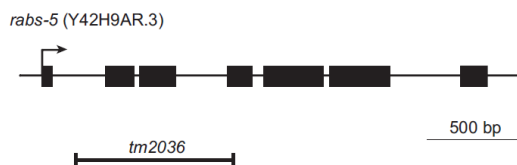


図2 : rabenosyn5 ホモログの欠失変異体 (tm2036) の模式図。黒い四角はエクソンを示す。遺伝子模式図下の実線は欠失部位を示す。

rabs-5 変異体のエンドサイトーシスアッ

セイを行い、*rab-5* ノックダウン個体および *vps-45* 変異体と同様のエンドサイトーシス表現型を示すことが明らかになった。また、研究方法(2)の方法を用いて *rab-5* および *vps-45* の発現解析を行ったところ、これらの遺伝子は腸、下皮、神経、筋肉、体腔細胞などユビキタスな発現パターンを示しており、さまざまな組織でのエンドサイトーシス経路に関与することが示唆された。

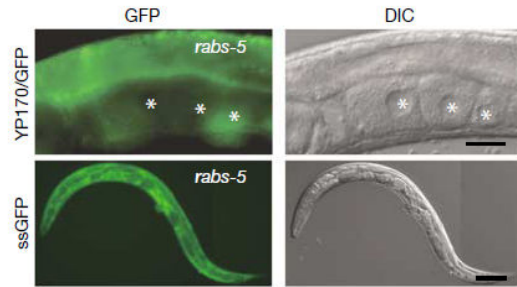


図3 : *rabs-5* 変異体のエンドサイトーシスアッセイ。*rabs-5* 変異体では卵黄蛋白質ピテロジェニン-GFP 融合タンパク質 (YP170/GFP) の卵母細胞への取り込みが顕著に抑制されている (上)。また、偽体腔内の GFP の体腔細胞への取り込みが顕著に抑制され、偽体腔に GFP 蓄積が認められる (下)。

(5) 研究方法(5)に従って、*vps-45* および *rabs-5* の体腔細胞内のオルガネラを解析した。その結果、これらの変異体ではエンドソームの大きさが顕著に小さく、一方リソソームの大きさにはほとんど異常が認められなかった。Dominant active 型 *rab5* (QL) を過剰発現させると巨大なエンドソームが形成されるが、*rab5* (QL) 表現型はこれらの遺伝子変異により抑制された。

(6) 小胞の膜への融合過程において、GTP-Rab (膜上に局在) と GDP-Rab (Rab GDI との結合によって細胞質中に存在) の状態を繰り返す Rab サイクルと、SNARE 複合体の形成と解離を繰り返す SNARE サイクルは、完全に独立したサイクルではなく密接に関連して機能していると考えられる。

Sec1/Munc18 は SNARE 蛋白質 syntaxin と結合し SNARE 複合体形成を制御することが知られている。VPS-45 が Rab エフェクターおよび SNARE 蛋白質と結合することにより、エンドソーム膜上での Rab・SNARE サイクルをリンクする働きを持つ可能性が示唆された。

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5件)

① 安藤恵子、モデル生物線虫から見た低分子量 G 蛋白質 Rab、細胞、42 (3)、2010、104-107. 査読無

② Kobayashi, T., Gengyo-Ando, K., Ishihara, T., Katsura, I. and Mitani, S. (2007): IFT-81 and IFT-74 are required for intraflagellar transport in *C. elegans*. *Genes Cells*, 12, 593-602. 査読有

③ Gengyo-Ando K, Kuroyanagi H, Kobayashi T, Murate M, Fujimoto K, Okabe S, Mitani S. The SM protein VPS-45 is required for RAB-5-dependent endocytic transport in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Reports*, 2007, 8(2), 152-7. 査読有

[学会発表] (計5件)

① 安藤恵子、中臺枝里子、三谷昌平、メンブレントラフィックに関与する線虫 Sec1/Munc18 ファミリーのゲノム機能解析第 61 回日本細胞生物学会・名古屋国際会議場・June 2 - 4, 2009

② Gengyo-Ando, K. & Mitani S. Functional genomics on membrane trafficking in *C. elegans*, International Symposium "Gene Expression Control and Genome Evolution" September 19-21, 2007, Okayama, Japan.

③ Gengyo-Ando, K., Kuroyanagi, H., Kobayashi, T., Murate, M., Fujimoto, K., Okabe, S., Mitani, S. Physiological roles of the Sec1/Munc18 family in the endosomal/lysosomal system of *C. elegans*. 16th International *C. elegans* Meeting, June 27-July1, 2007, Los Angeles, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.saitama-u.ac.jp/iron/hP-kenkyo/shinkou/nou.htm>

6. 研究組織

研究代表者

安藤 恵子 (ANDO KEIKO)

埼玉大学・総合研究機構脳科学融合研究センター・特任准教授

研究者番号：40221741