

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790056
 研究課題名（和文） エンドサイトーシスにおける複数の低分子量G蛋白質の活性制御機構の統合的な理解
 研究課題名（英文） The mechanism of endocytosis regulated by orchestrated activations of multiple small GTPases
 研究代表者
 梶保 博昭 (KAJIHO HIROAKI)
 東京大学・大学院薬学系研究科・助教
 研究者番号：70401221

研究成果の概要（和文）：

生物の基本単位である細胞が生存していくためには、外界との物質交換が必要である。その際に細胞は小胞を形成して必要に応じて物質を取り込んでいる。本研究ではこの物質輸送のメカニズムを明らかにする事を目的として、Rab5という低分子量G蛋白質（“On”, “Off”状態を取る事で輸送を制御すると言われていた分子）を活性化する RIN family に関する研究を行い、RIN family が Rab5 以外にも複数の Rab を活性化する事を見出した。

研究成果の概要（英文）：

Exchanging materials between outer environments is essential for cells to maintain their homeostasis. Cells accomplish it by utilizing vesicular trafficking called endocytosis and exocytosis. Rab proteins are part of the Ras superfamily of small GTPases, which works switch molecules by undergoing a cycle between GDP-bound and GTP-bound form. Our research is focused on the molecular mechanism how Rab5, one of Rab family, regulates endocytosis. We have elucidated that multiple Rab proteins are activated by RIN family proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：エンドサイトーシス、メンブレントラフィック

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞膜から初期エンドソームに向けての輸送小胞によるエンドサイトーシスにおいて、低分子量G蛋白質である Rab5 が

中心的な役割を果たすことが知られているが、エンドサイトーシスにおける低分子量G蛋白質に関する新しい知見は Rab5 を含め今なお集積しており、エンドサイトー

シスをめぐる研究動向も新たな局面を迎えており、細胞機能に立脚した制御メカニズムの解明とその制御系が介在する生理的意義や合目的性についてのより深く統合的な理解が必要な段階へと進んでいる。(2)特に、複数の低分子量G蛋白質をリンクする足場/プラットフォーム因子の同定、あるいは輸送する物質に応じて複数の低分子量G蛋白質がどのように使い分けられるのか、またそれらの時間・空間的に活性化が調節される機構など未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

創薬研究とも密接に関わる細胞のエンドサイトーシス制御機構をより精密に同定するために、「エンドサイトーシスにおける複数の低分子量G蛋白質の活性制御機構の統合的な理解」という視点に立った解析を目的とし、これまでの申請者らの研究領域を踏まえて、様々なチロシンキナーゼ系受容体刺激に伴う細胞内シグナル伝達における Ras ファミリーと Rab5 ファミリーのクロストークによるエンドサイトーシスの制御機構の解明を試みた。

3. 研究の方法

研究代表者は先に RIN 因子群が Rab5 を活性化する事を見出していた。そこで、RIN 因子群が Rab5 と相同性の高い Rab21, 22, 31 を活性化するかを生化学的解析、細胞生物学的解析により解析した。

(1) RIN 因子群に結合する Ras ファミリーの同定

RIN の RA ドメインに結合する Ras ファミリーを同定する。様々な Ras ファミリーの恒常的活性化変異体のリコンビナント体 (GST 融合蛋白質) を大腸菌より精製する。RIN 因子群は FLAG タグを付けてバキュロウイルス発現系を用いて発現/精製する。これらを混合し、抗 FLAG 抗体による免疫沈降法あるいは GST プルダウン法により、RIN 因子-Ras ファミリー複合体を同定する

(2) RIN 因子群による Rab5 サブファミリーに対する GEF (Guanine nucleotide exchange factor) 活性の in vitro 評価

FLAG-RIN 因子群を昆虫細胞由来 Sf9 細胞にバキュロウイルスを用いて感染/発現させ、アフィニティーカラムにより精製し、リコンビナント体を作製した。Rab5 ファミリー (Rab5, Rab21, Rab22, Rab31) は GST-融合蛋白質として大腸菌から精製した。Rab5 サブファミリーに対する

[³⁵S]-GTPγS 結合活性により RIN 因子群の GEF 活性を評価した。

(3) RIN 因子群による Rab5 サブファミリーに対する GEF 活性の in cell 評価

培養細胞内での Rab5 ファミリーのヌクレオチドフォームを指標に検討する。培養細胞に RIN、Rab5 を発現させた後に、細胞内のヌクレオチドを [³²P]によりラベルする。Rab5 ファミリーを免疫沈降し、結合した GDP/GTP の比率を定量する。さらに RIN のノックダウンや RIN の各機能ドメインを欠く変異体の遺伝子導入が与える効果を検討する。

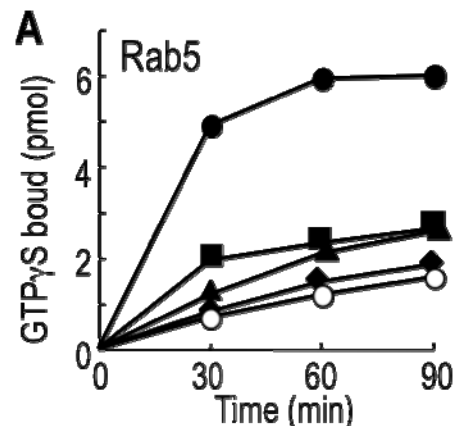
4. 研究成果

(1) RIN 因子群に結合する Ras ファミリーの同定

リコンビナント体の活性型 Ras と RIN 因子群との結合実験を行った結果、RIN2 が H-Ras および R-Ras と結合することを見いだした。この結合が培養細胞内でも起きるかを検討した。myc-H-Ras の野生型、活性化型変異体、不活性化型変異体と FLAG-RIN2 を HEK293T 細胞に発現させ、FLAG 抗体により免疫沈降したところ、RIN2 が H-Ras の野生型および活性化型変異体と相互作用した。さらに RIN2 の C 末に存在する RA (Ras Association) ドメインを欠損した変異体は H-Ras とは相互作用しなかったことから、RIN2 は RA ドメインを介して GTP 型 (活性化型) H-Ras と相互作用することが明らかとなった。

(2) RIN 因子群による Rab5 サブファミリーに対する GEF 活性の in vitro 評価

精製 RIN 因子群および他の Rab5 GEF である Rabex-5 による Rab5 サブファミリーへの GEF 活性を検討した (図 1A-D)。Rabex-5 は Rab5 以外に Rab21 に対しても GEF 活性を示した (過去の知見通り)。一方、RIN2, RIN3 は Rab21 に対しては GEF 活性を示さなかったが、Rab5, Rab22, Rab31 に対して顕著な GEF 活性を示した。



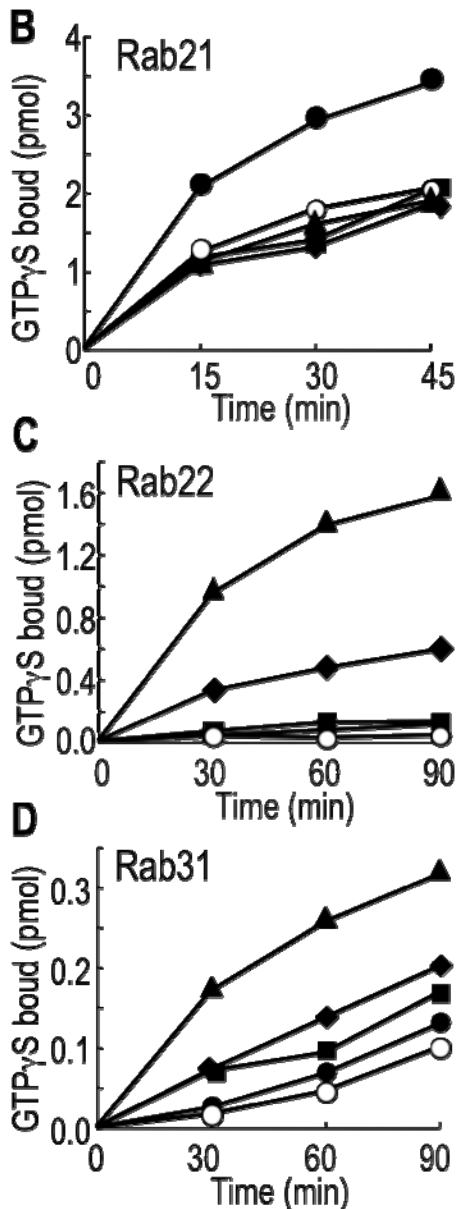


図1 $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S 結合アッセイによる RIN 因子群による Rab5 サブファミリーに対する GEF 活性の *in vitro* 評価。10 pmol Rab5(A), Rab21(B), Rab22 (C), Rab31(D) に対して 8 pmol Rabex-5(●), RIN1(■), RIN2(◆), RIN3(▲), 無添加(○)を加え、30°Cで反応させて Rab に結合した放射活性を測定。

- (3) RIN 因子群による Rab5 サブファミリーに対する GEF 活性の *in cell* 評価
In vitro で評価した RIN 因子群の Rab5 サブファミリーへの GEF 活性が培養細胞内でも見られるかを検討した。 $[^{32}\text{P}]$ 標識した HEK293T 細胞から Rab5 を免疫沈降した画分に結合しているヌクレオチドを TLC 展開し、その放射活性を定量することで、Rab の GDP, GTP 結合量を評価することが出来る。図 2 には Rab31 で行った結果を

示す。RIN 因子群および Rabex-5 の中でも RIN2, RIN3 は顕著に GTP 型 Rab31 の割合を増加させた。

さらに、RIN 因子群は Rab5 GEF に保存された VPS9 ドメインを有しており、VPS9 ドメイン内に GEF 活性に必要なアミノ酸も保存されている。そこで、RIN 因子群の VPS9 ドメイン変異体を 2 種作製し、同様に細胞内の Rab31 への GEF 活性を測定したところ、RIN 因子群の変異体はすべて Rab31 への GEF 活性を喪失していた。以上のことから、RIN 因子群、中でも RIN2, RIN3 は Rab5 以外にも Rab22, Rab31 へ GEF 活性を示すことが生化学的に示され

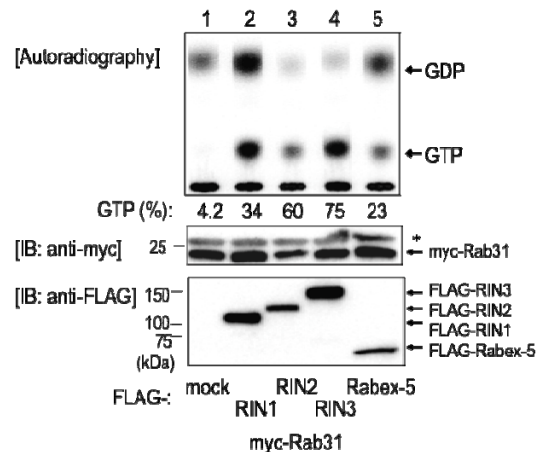


図2 $[^{35}\text{P}]$ 無機リンを用いた RIN 因子群による Rab31 に対する GEF 活性の *in cell* 評価。myc-Rab31 と FLAG-RIN1, RIN2, RIN3, Rabex-5 を HEK293T 細胞に発現させ抗 myc 抗体で免疫沈降後した画分に含まれるヌクレオチドを TLC により展開。

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) Nakagawa K, Sugahara M, Yamasaki T, Kajiho H, Takahashi S, Hirayama J, Minami Y, Ohta Y, Watanabe T, Hata Y, Katada T, Nishina H. Filamin associates with stress signaling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK activation., THE BIOCHEMICAL JOURNAL, **427**:237-245 (2010), 査読有
- (2) Saito R, Yamasaki T, Nagai Y, Wu J, Kajiho H, Yokoi T, Noda E, Nishina S, Niwa H, Azuma N, Katada T, Nishina H. CrxOS maintains the self-renewal capacity of murine embryonic stem cells.,

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, **390**:1129-1135 (2009), 査読有

- (3) Kobayashi T, Hori Y, Ueda N, Kajiho H, Muraoka S, Shima F, Kataoka T, Kontani K, Katada T.; Biochemical characterization of missense mutations in the Arf/Arl-family small GTPase Arl6 causing Bardet-Biedl syndrome., BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, **381**:439-432 (2009), 査読有
- (4) Tanemura S, Momose H, Shimizu N, Kitagawa D, Seo J, Yamasaki T, Nakagawa K, Kajiho H, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Blockage by SP600125 of Fcepsilon receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. J Biochem., **145**:345-354 (2009), 査読有
- (5) Yoshikawa M*, Kajiho H*, Sakurai K, Minoda T, Nakagawa S, Kontani K, Katada T. Tyr-phosphorylation signals translocate RIN3, the small GTPase Rab5-GEF, to early endocytic vesicles. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, **372**:168-172 (2008), 査読有 (*:equally contributed)

[学会発表] (計 21 件)

- (1) 梶保 博昭、池田 誠一、福島 慎一、堅田 利明；低分子量G蛋白質 Rab5GEF RIN ファミリーによる小胞輸送の機構解析 (口頭発表) [第一回 GPCM; 2010 年 2 月 7 日/東京]
- (2) 梶保 博昭、堅田 利明；RIN3 のリン酸化状態による Rab5 サブファミリーへの GEF 活性調節機構 (WS 口頭発表) [文部科学省特定領域研究「細胞情報ネットワークを統合するG蛋白質シグナル研究の新展開」班会議；2009 年 9 月 12 日/南房総・富浦]
- (3) 梶保 博昭、堅田 利明；RIN ファミリーによる低分子量G蛋白質 Rab31 の活性化機構解析 (ポスター発表) [定量生物学の会 第 1 回年会；2009 年 1 月 11 日/東京]
- (4) Hiroaki Kajiho, Manabu Yoshikawa, Kyoko Sakurai, Tomohiro Minoda, Satoshi Nakagawa, Kenji Kontani, and Toshiaki Katada [Poster]: Tyr-phosphorylation

signals translocate RIN3, the small GTPase Rab5-GEF, to early endocytic vesicles. [48th ASCB Annual Meeting; 2008 年 12 月 17 日/米国、サンフランシスコ]

- (5) 梶保 博昭、吉川 学、堅田 利明；Rab5 結合蛋白質 RIN3 の小胞局在化機能解析 [文部科学省特定領域研究「細胞情報ネットワークを統合するG蛋白質シグナル研究の新展開」班会議；2008 年 9 月 19 日/湯沢]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶保 博昭 (KAJIHO HIROAKI)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：70401221

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者