

機関番号： 82401

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21870050

研究課題名（和文）

出芽酵母 Rab カスケードにおける Rab 活性変化の視覚化

研究課題名（英文）Visualization of the spatio-temporal activities of Rab GTPases forming Rab cascades

研究代表者

墨谷 暢子 (SUMIYA NOBUKO)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・特別研究員

研究者番号： 80534601

研究成果の概要（和文）：

出芽酵母 Rab GTPase ファミリーのうち、小胞体ゴルジ体間の輸送に関与する Ypt1p、ゴルジ体からの分泌小胞の輸送に関与する Ypt31/32p、分泌小胞の細胞膜への輸送と結合に関与する Sec4p はカスケード様にはたらくと考えられている。本研究課題ではこれら Rab GTPase が細胞内において、いつどこではたらくのかを可視化できる 1 分子型 FRET プローブを作成し、これを用いた解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Rab GTPase cascade in the regulation of ER-to-Golgi step of the secretory pathway was proposed in *Saccharomyces cerevisiae*. Ypt1p involved to ER to *cis*-Golgi transport acts upstream of the Ypt31/32p, mediating the budding of post-Golgi vesicles from the *trans*-Golgi. Ypt31/32p acts upstream of Sec4p, the Rab GTPase associated with post Golgi derived secretory vesicles. In this study, I developed the intra molecular FRET probes of these Rab GTPases to visualize the spatio-temporal activities in the living yeast cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,060,000	318,000	1,378,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,070,000	621,000	2,691,000

研究分野：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、出芽酵母、分泌小胞、Rab GTPase、FRET

1. 研究開始当初の背景

Rab GTPase は、不活性型の GDP 結合型と活性型の GTP 結合型をサイクルすることにより

細胞内小胞輸送過程の調節因子としてはたらく。細胞内小胞輸送のうち、小胞体ゴルジ体間とゴルジ体層板間の輸送には Ypt1p が、ゴルジ体からの

分泌小胞の出芽には Ypt31/32p が、分泌小胞の輸送と細胞膜への融合には Sec4p が関与する。Ypt1p のエフェクターが Ypt31/32p の活性化因子 (GEF) であり、Ypt31/32p のエフェクターが Sec4p の GEF の Sec2p であることから、Ypt1p、Ypt31/32p、Sec4p は Rab カスケードを形成すると考えられている。これらの知見は遺伝学的、生化学的手法と局在情報の組み合わせによって明らかにされたものである。しかし Rab は GTP 結合型となつてはじめて活性化することから、ただ局在情報を得ただけでは Rab が真に機能する場を理解することはできない。細胞膜へ向かう分泌経路のいつ、どこでこれらの Rab がどのような活性状態になるか、またそれぞれの関連性が重要であろうと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Rab カスケードにおける Ypt1p、Ypt31/32p、Sec4p の活性状態の時空間的情報とそれぞれの関係性を視覚化することである。このために出芽酵母ではほとんど報告例はない Rab GTPase の細胞内における時空間活性の可視化に有効である 1 分子型 FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) プローブを作成する。この作成過程を通して、出芽酵母における 1 分子型 FRET プローブを用いた解析法の確立も目指す。

3. 研究の方法

1 分子型 FRET プローブとは FRET が起こる蛍光タンパク質ペア (CFP と YFP) と Rab GTPase と活性型 Rab に結合するタンパク質ドメインを一つの融合タンパク質としたものである。プローブ内で活性型 Rab GTPase と活性型 Rab に結合するタンパク質ドメインが相互作用して FRET が起こる (図 1)。

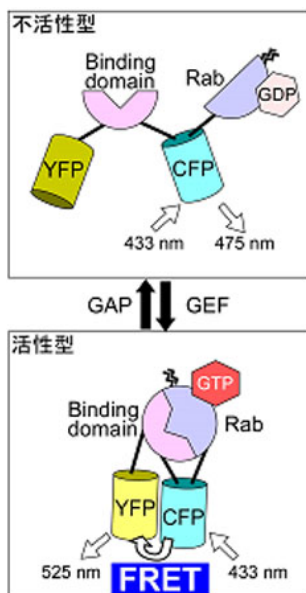


図 1 本研究課題で作成した 1 分子型 FRET プローブの模式図。Rab が活性化すると、プローブ内の活性型 Rab 結合ドメインが Rab に結合してプローブの構造が変化する。この構造変化により CFP と YFP が近接すると、CFP の励起により YFP の蛍光が検出される。

本研究課題では、この 1 分子型 FRET プローブを作成し、出芽酵母の細胞内における FRET プローブの局在と FRET 効率変化を解析することによって Rab GTPase の時空間活性の可視化を行う。また、Rab に関わる他のタンパク質との局在を比較することで Rab の構造変化が膜輸送にどのように関与するのか視覚的に示すことを目指す。

4. 研究成果

(1) Ypt1p プローブの作成

活性型 Ypt1p に結合するタンパク質 (エフェクター) としては Uso1p と COG2/3p が知られている。COG2/3p は複合体の形ではじめて Ypt1p と結合できるため、プローブに用いるには難しいと考えられた。そこで活性型 Ypt1p を認識するドメインとして Uso1p のエフェクタードメインの採用を検討した。Uso1p のエフェクタードメインは特定されていなかったため、まず GST プルダウン法によりエフェクタードメインの探索を行った。その結果エフェクタードメインを 350 アミノ酸まで絞りこむことができた。このドメインを用いて Ypt1p のプローブ作製を行った。しかし、このプローブは Ypt1p の局在を反映できなかった。Ypt1p の mammal のホモログである Rab1 のエフェクタータンパク質のエフェクタードメインを用いても同様に Ypt1p と同一の局在を示す FRET プローブを得ることができなかった。

(2) Ypt31/32p プローブの作成

Ypt31/32p のエフェクターとしては Sec2p、Rcy1p、Gyp1p が報告されている。それぞれの Ypt32p 結合ドメインは、Sec2p は 161-374 アミノ酸部分、Rcy1p は 414-868 アミノ酸部分、Gyp1p は 1-210 アミノ酸部分であると報告されている。この報告をもとにプローブの作成を試みた。局在が観察できたプローブにおいては Ypt31/32p と類似した局在を示した。しかし、Ypt31/32p の活性型に応じて FRET 効率が増加するプローブは、現在まで得られておらず今後の課題である。

(3) Sec4p プローブの作成

Sec4p のエフェクターとしては Sec15p と Sro7p の 2 つが報告されている。Sec15p の C 末が活性型 Sec4p へ結合すると報告されていた。そこで Sec15p の C 末領域を用いたプローブ作成を行った。このプローブは Sec4p と同様の局在を示したが、プローブの FRET 効率は Sec4p の活性状態を反映しなかった。GST プルダウン法により Sec15p のエフェクタードメインを C 末領域のうちの 200 アミノ酸にしぼり、これを用いた改良型 FRET プローブを作成した。このプローブは Sec4p と類似した局在を示した。しかし詳細に観察するとこのプローブの発現は細胞内で蛍光を有する凝集体の形成を起こすことがわかった。このため Sec15p を用いたプローブ作成は困難であると判断した。もう一つの

エフェクターである Sro7p はエフェクタードメインが全く報告されていなかった。GST プルダウン法により、C 末にエフェクタードメインが存在することをつきとめた。この Sro7p の C 末領域を用いて作成した FRET プロブは Sec4p の活性状態を反映した FRET 効率の変化を示し、Sec4p と全く同じ局在を示すことが確認された。

(4) Sec4p の FRET プロブを用いた解析

分泌小胞の細胞膜への輸送と結合に関与する Sec4p は主に成長する芽の先端と、細胞質分裂時の分裂面に局在する。芽の先端における Sec4p の活性を詳細に解析すると、より芽の先端、細胞膜付近にて活性化していることがわかった。一方で Sec4p の量が最も多いのは最も活性化した領域の内部であった(図 2)。成長する芽においては Sec4p の量と活性の高さに位置の違いがあることが明らかとなった。

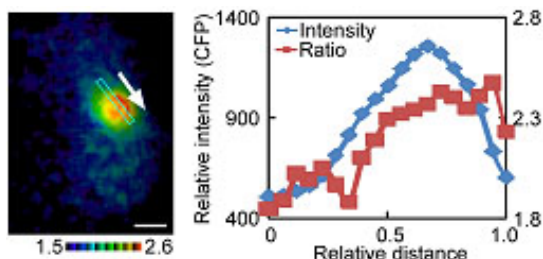


図 2. 成長する芽における Sec4p の活性
左:FRET 効率の擬似カラー像 赤いほど活性が高い。右:FRET 効率と存在量の比較。左図の白矢印で示した方向にしたがって芽の断面における FRET 効率(赤)とプロブの存在量(青)を比較した。FRET 効率はプロブの量の最大値よりもより先端(右)側で最大値を示した。

次に分裂面における Sec4p の活性についても詳細に解析した。出芽酵母の細胞質分裂では、まず分裂タンパク質の足場となるセプチンリングの間に収縮環であるアクトミオシンリングが形成される。アクトミオシンリングの収縮とともにキチンを主成分とする一次隔壁が形成される。一次隔壁の両面にマンナンやグルカンを主成分とする二次隔壁が形成される。最後に一次隔壁を分解することにより母細胞と娘細胞は分離する。この間、Sec4p はアクトミオシンリング付近に出現し、アクトミオシンリングが収縮して消失するとセプチンリングの間で母細胞側と娘細胞側の 2 つに分かれる。Sec4p の活性ははじめアクトミオシンリング付近で高く、アクトミオシンリングの消失直前(Sec4p の母細胞側と娘細胞側への分離の直前)にセプチンリングの内側の領域で高くなった(図 3、4)。

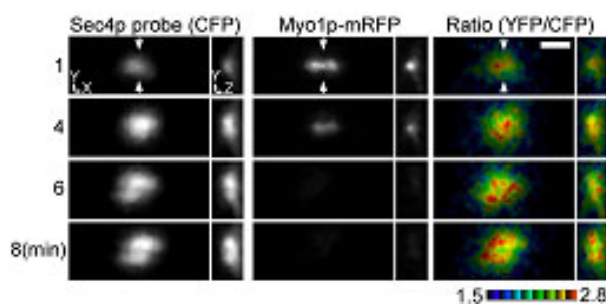


図 3. アクトミオシンリング収縮時の Sec4p の活性変化。左から Sec4p プロブの局在、アクトミオシンリングを構成するタンパク質のひとつの Myo1p の局在、FRET 効率の擬似カラー像を示す。Sec4p の活性は Myo1p の近傍からその両端へと移動した。

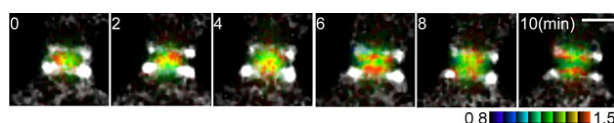


図 4. 細胞質分裂時の Sec4p の活性変化とセプチンリングの局在。セプチンリングを構成するタンパク質のひとつ Cdc3p の局在を白で重ねあわせた。Sec4p はセプチンリング間に局在した。はじめはより内側で活性が高いが、活性の高い領域はセプチン付近へと移動した。

一次隔壁形成と Sec4p 活性の関連性が示唆されたため、一次隔壁が形成されず分裂面側面の細胞壁が肥大化して分裂する変異体、*myo1Δ* と *chs2Δ* における Sec4p の局在と活性を解析した。Sec4p は野生型ではセプチンリング間に一様に局在するのに対し、*myo1Δ* と *chs2Δ* では特に側面の細胞壁に強く局在し、そこで高い活性を示した。分裂面の内部に着目すると、分裂面に対して垂直方向に Sec4p 活性はランダムに移動することが観察された。これより *myo1Δ* と *chs2Δ* では一次隔壁が形成されないために Sec4p 活性の空間制御が不安定になると考えられた。次にセプチンが分裂面だけでなく異所にも局在する変異体 *cla4Δ* において Sec4p の局在と活性を調べた。Sec4p は細胞質分裂面や成長する芽の先端だけでなく異常な局在を示したセプチン付近にも観察された。この Sec4p の活性はセプチンに隣接した領域で特に高まった。野生型でアクトミオシンリング消失直前にみられた Sec4p 活性のセプチン内側への移動は、セプチンに依存しておこったものである可能性が示唆された。

(5) Sec4p の活性と Ypt31/32p の関連

Sec4p プロブの FRET 効率と Rab カスケードで Sec4p の上流に位置する Ypt31/32p の局在の比較を行った。Sec4p と Ypt31/32p ともに主な局在は成長する芽の先端と分裂面で一致した。これらの場所では Sec4p の活性は細胞質より高かった。さらに Ypt31p の局在と Sec4p の活性の関連性について

て明らかにするために輸送される分泌小胞に結合していると思われる細胞質内のドット状の局在について観察した。Sec4p のドット状局在と Ypt31p のドット状局在が重なりあうと Sec4p の活性がより高まることが明らかになった。

(6) FRET プローブ作成についてまとめ

今回の研究期間の中では Sec4p のプローブは得ることができたが、Ypt1p、Ypt31/32p のプローブは得られなかった。特に Ypt1p に至っては局在自体が異常になってしまった。Sec4p の GEF は 1 つのタンパク質 (Sec2p) だけであるのに対し、Ypt1p、Ypt31/32p の GEF は複合体 (TRAPP I/II) として初めて機能する。Rab GTPase 自身の分子量は 25 kD 弱であるが、1 分子型 FRET プローブではこれに 30 kDa 弱の大きさの蛍光タンパク質 2 つとエフェクタードメインを融合させている。このために FRET プローブ内の Rab GTPase に GEF が結合できなくなった結果、Rab GTPase の活性化や正しい場所への局在ができなくなった可能性がある。プローブ内のタンパク質の順番をいれかえることや、さらなるエフェクタードメインの絞り込みを行うことにより、立体構造の障害を最低限にすることがこれらのプローブ作成には必要であると考えられる。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 墨谷暢子、黒川量雄、中野明彦. The spatio-temporal activities of Sec4p in living yeast cells. 分子生物学会・生化学会合同大会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸
- ② 墨谷暢子、黒川量雄、中野明彦. 出芽酵母における Sec4p の時空間活性の可視化酵母遺伝学フォーラム、2010 年 9 月 9-11 日、奈良
- ③ Nobuko Sumiya, Kazuo Kurokawa, Akihiko Nakano. Visualization of the spatio-temporal activities of Sec4p and Ypt1p in living yeast cells. The 30th Sapporo International Cancer Symposium “Membrane Traffic And Cancer” 2010 年 6 月 28-29 日、札幌
- ④ 墨谷暢子、黒川量雄、中野明彦. 出芽酵母生細胞における Rab GTPase の時空間活性の可視化 細胞生物学会、2010 年 5 月 19-21 日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

墨谷 暢子 (SUMIYA NOBUKO)

独立行政法人理化学研究所・中野生体膜研究室・特別研究員

80534601

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者