

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23370083

研究課題名(和文)膜オルガネラ動態を制御する新しいタイプの低分子量G蛋白質群の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of atypical small GTPases involved in membrane dynamics

研究代表者

紺谷 圈二(Kontani, Kenji)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30302615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では各種の新しい低分子量Gタンパク質に関して多角的な解析を行い、1) ARL8がファゴソームとリソソームの融合に寄与し、アポトーシス細胞の効率的除去に必要であること、2) Arl13bのN末端のパルミトイル化修飾とC末端近傍のRVxPモチーフの両方が、Arl13bの一次繊毛への局在化に必要であること、3) Di-Ras2がSmgGDSとの相互作用により、活性制御を受ける可能性があること、4) 線虫においてDi-Rasが神経細胞からのアセチルコリンの放出に促進的に機能すること、を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed some atypical small GTPases and found that 1) ARL8 is involved in phagosome-lysosome fusion and required for efficient removal of apoptotic cells; 2) both the N-terminal palmitoylation and the C-terminal RVxP motif of Arl13b are required for the ciliary localization of Arl13b; 3) Di-Ras2 activity may be regulated via interaction with SmgGDS; 4) C. elegans Di-Ras homolog functions as a positive regulator for acetylcholine release from neuronal cells.

研究分野：生物化学

キーワード：低分子量Gタンパク質 メンブランチラフィック オルガネラ 線虫

1. 研究開始当初の背景

低分子量G蛋白質ファミリーは、Ras、Rho/Rac、Rab、Arf、Ranといったサブファミリーからなり、GTPとGDPの交換反応に伴う活性化状態の変化を介して、シグナル伝達系、膜輸送系、細胞骨格系などにおいて重要な分子スイッチとして機能している。一方で近年、生化学的性状あるいは一次構造の観点から、既存の低分子量G蛋白質ファミリーとは異なる“アтипカル”な機能未知の低分子量G蛋白質群が多数存在することが明らかとなり、G蛋白質の活性調節機構と生理機能は新たな展開を見せつつある。例えば研究代表者らは先に、神経細胞特異的に発現するDi-Rasや、リソソームなどの酸性オルガネラに局在するArl8が、一般的なG蛋白質通常GDP結合型で存在するのとは対照的に、主にGTPを結合した状態で待機していることを明らかにしてきた。また、グアニンヌクレオチドとの結合に必要なGドメインに加えて、EFハンド、コイルドコイル、プロリンリッチドメインなどを有するRab45やArl13bなどのマルチ機能ドメインG蛋白質の同定と生化学的性状を報告してきた。研究代表者らは、これらのアтипカル低分子量G蛋白質群の機能解析を進め、それらがリソソームや一次繊毛といったオルガネラの形成・機能に関与することを示唆する知見を見いだした。以上のような研究経緯から研究代表者は、生化学的解析・ライブイメージング・線虫を用いた個体レベルの解析等の多角的な研究アプローチによる、“膜オルガネラ動態を制御する新しいタイプの低分子量G蛋白質群の機能解析”という本研究課題を提唱するに至った。

2. 研究の目的

リソソームの融合は効率的な物質分解に重要であるが、そのメカニズムは余り良く分かっていない。これまで知られている低分子量Gタンパク質の中でArl8は唯一、主にリソソームに局在するGタンパク質であり、Arl8がリソソームの融合などの機能動態を制御する可能性に関して、線虫や培養細胞を用いて検討する。

一次繊毛は、細胞膜から突出した細胞小器官であり、その形成・機能異常が、囊胞腎、Bardet-Biedl症候群、Joubert症候群などの疾患の原因であることが明らかとなっている。一次繊毛に局在するマルチ機能ドメインGタンパク質Arl13bは、Joubert症候群の原因遺伝子であるが、その機能的役割に関しては未解明な点が多い。本研究ではArl13bの繊毛への局在化機構や機能に関して、主に培養細胞を用いて解析する。

神経組織特異的に発現細胞内で主にGTP結合型で存在するというアтипカルな生化学的特徴を示すDi-Rasは、神経組織特異的に発現することを見いだしているが、その機能は未解明である。そこで本研究ではDi-Rasの活性制御機構及び線虫変異体を用いた機能

解析を行う。

3. 研究の方法

(1) リソソームにおけるArl8の機能解析
線虫Arl8欠損変異体(*arl-8*変異体)の生殖腺では、アポトーシス細胞が蓄積するという表現型を見いだしている。そこでアポトーシス細胞の出現頻度、アポトーシス細胞の食食度合い、アポトーシス細胞を含有するファゴソームの成熟状態などを各種のマーカータンパク質を用いて検討する。また、Arl8の周辺因子群を同定する目的で、*arl-8*変異体と同様の表現型を示す変異体をRNAiスクリーニングにより探索する。得られた因子群に関して、Arl8との遺伝学的・物理的相互作用を検討する。

(2) Arl13bの一次繊毛への局在化機構の解析

前述のようにArl13bはGドメインに加えて、コイルドコイル、プロリンリッチドメインを有している。一次繊毛への局在化に必要なドメインを同定する目的で、各種のArl13b欠損変異体の細胞内局在を検討し、Arl13bの繊毛への輸送機構を解析する。

(3) Di-Rasの生化学的特性及び機能解析

内在性Di-Rasの特性を調べるためにDi-Rasの2つのサブタイプ(Di-Ras1とDi-Ras2)を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し、それらを用いてDi-Rasの発現パターンや局在を検討する。また予備的実験から線虫Di-Rasが神経細胞特異的に発現していることを見いだしているため、線虫Di-Rasの欠損変異体(*drn-1*変異体)を用いて、神経機能におけるDi-Rasの生理的役割を解析する。

4. 研究成果

(1) Arl8はファゴソームとリソソームの融合に寄与する。

*arl-8*変異体ではアポトーシス細胞の出現頻度は正常であるが、食食細胞 sheath cellsでの分解が非常に遅延することが、アポトーシス細胞の蓄積の原因であることが明らかになった。アポトーシス細胞を取り込んだファゴソームは、ファゴソームの成熟初期マーカーであるRAB-5及び成熟後期マーカーであるRAB-7の局在は野生型と同様であったことから、ファゴソームは後期段階までは成熟することが明らかになった。一方、最終的に起こるべきリソソームとの融合が殆ど観察されなかった。以上の結果から、Arl8はファゴソームとリソソームの融合過程に促進的に機能し、アポトーシス細胞の効率的な分解除去に重要な低分子量Gタンパク質であることが明らかとなった。さらに*arl-8*変異体と同様の表現型を示す変異体を探索した結果、HOPS複合体の構成因子である*vps-39*や*vps-41*の欠損変異体が*arl-8*変異体と同様の表現型(アポトーシス細胞の蓄積)を示すことを見いだした。さらに生化学的解析から、Arl8のGTP

結合型が VPS-41 と物理的に相互作用することを見だし、VPS-41 が Arl8 のエフェクターとして機能することが示唆された。酵母では、HOPS 複合体は液胞の膜に局在し、繋ぎ止め因子とし液胞の融合を正に制御していることから、Arl8 は HOPS 複合体をリソソームやファゴソームにリクルートすることで、それらの融合に寄与しているのではないかと考えられた。

(2) Arl13b の絨毛局在性に関する解析

Arl13b の各種欠損変異体・点変異体の細胞内局在解析から、Arl13b の絨毛局在性には、N 末端のパルミトイル化修飾と C 末端近傍に存在する RVxP モチーフの両者が必要であることが明らかとなった。RVxP モチーフの絨毛局在性における十分性を調べる目的で、ゴルジ体に局在する膜タンパク質に RVxP 配列を付与したところ、それが絨毛に局在するようになった。またゴルジ体に局在する DHHC ファミリータンパク質によって、Arl13b がパルミトイル化修飾される可能性を見いだした。以上の結果から、Arl13b は、ゴルジ体でパルミトイル化修飾を受けたのち、RVxP モチーフが認識されて絨毛へと輸送される可能性が考えられた。

(3) Di-Ras の機能解析

Di-Ras1 及び Di-Ras2 に対して特異的なモノクローナル抗体を作製し、それぞれの発現を検討したところ、脳における Di-Ras は Di-Ras2 がメインであり、Di-Ras1 は殆ど発現していないことが明らかとなった。ラット脳ホモジェネートを用いた検討から、Di-Ras2 は細胞膜に加えて細胞質にも存在することを見いだした。さらに、細胞質中の Di-Ras2 は SmgGDS と複合体を形成していることを見いだした。SmgGDS は RhoA などの低分子量 G タンパク質に対してグアニンヌクレオチド交換促進活性を有することが知られている分子である。SmgGDS が Di-Ras2 に与える影響について検討したところ、SmgGDS によって Di-Ras2 の GDP 及び GTP に対する親和性が低下することが明らかとなった。また、培養細胞レベルにおいても、Di-Ras2 のグアニンヌクレオチド結合量は SmgGDS の共発現により減少した。よって、RhoA などに対する効果とは異なり、SmgGDS との結合によって Di-Ras2 のグアニンヌクレオチド親和性は低下すると考えられた。また、パルスチェイス法により Di-Ras2 と SmgGDS の動態を解析したところ、Di-Ras2 は生合成後速やかに SmgGDS と結合し、その結合により Di-Ras2 の安定性が上昇することが明らかとなった。以上により、Di-Ras2 は生合成後に SmgGDS と複合体を形成し、細胞質中でグアニンヌクレオチド低親和性の状態で存在するという活性制御を受けている可能性が示唆された。

さらに Di-Ras の生理的役割を解析する目的で、線虫 Di-Ras 欠損変異体 (*drn-1* 変異体) を用いた薬理的解析を行った。その結果、

drn-1 変異体は野生型に比べて、aldicarb に低感受性であり、levamisol に対しては同程度の感受性を示すことが分かり、*drn-1* 変異体では神経筋接合部におけるアセチルコリンの放出量が低下していることが示唆された。さらに生化学的解析から、Di-Ras が神経伝達物質の放出に関与する Epac2 と物理的に相互作用することを見いだした。以上により、Di-Ras は Epac2 と協調して、神経細胞からの神経伝達物質放出に寄与することが考えられた。

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 11 件) すべて査読有り

①Cevik, S., Sanders, A., Wijk, E., Boldt, K., Clarke, A., van Reeuwijk, J., Hori, Y., Horn, N., Hetterchijt, L., Wdowicz, A., Mullins, A., Kida, K., Kaplan, O., van Beersum, S., Wu, K., Letteboer, S., Mans, D., Katada, T., Kontani, K., Ueffing, M., Roepman, R., Kremer, H., Blacque, O. (2013). Active transport and diffusion barriers restrict Joubert Syndrome-associated ARL13B/ARL-13 to an Inv-like ciliary membrane subdomain *PLoS Gen*, 9, e1003977.
doi: 10.1371/journal.pgen.1003977.

②Su, S., Phua, SC., DeRose, R., Chiba, S., Narita, K., Kalugin, PN., Katada, T., Kontani, K., Takeda, S., Inoue, T. (2013). Genetically encoded calcium indicator illuminates calcium dynamics in primary cilia. *Nature Methods*, 10, 1105-1107.
doi: 10.1038/nmeth.2647.

③ Sasaki, A., Nakae, I., Nagasawa, M., Hashimoto, K., Abe, F., Saito, K., Fukuyama, M., Gengyo-Ando, A., Mitani, S., Katada, T., Kontani, K.* (2013). Arl8/ARL-8 functions in apoptotic cell removal by mediating phagolysosome formation in *C. elegans*. *Mol Biol Cell*, 24, 1584-1592. (*Corresponding author)
doi: 10.1091/mbc.E12-08-0628.

④ Kasuga, H., Fukuyama, M., Kitazawa, A., Kontani, K., Katada, T. (2013). The microRNA *mir-235* couples blast cell quiescence to the nutritional state *Nature*, 497, 503-506.
doi: 10.1038/nature12117.

⑤Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi H., Yasuda T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y. L., Mano, H. (2013). Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 3029-3034.
doi: 10.1073/pnas.1216141110.

⑥Takasuga, S., Horie, Y., Sasaki, J., Sun-Wada, G.

H., Kawamura, N., Iizuka, R., Mizuno, K., Eguchi, S., Kofuji, S., Kimura, H., Yamazaki, M., Horie, C., Odanaka, E., Sato, Y., Chida, S., Kontani, K., Harada, A., Katada, T., Suzuki, A., Wada, Y., Ohnishi, H., Sasaki, T. (2013). Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 110, 1726-1731.
doi: 10.1073/pnas.1213212110.

⑦Tada, M., Gengyo-Ando, K., Kobayashi T., Fukuyama, M., Mitani, S., Kontani, K.*, Katada, T. (2012). The neuronally expressed Ras-family GTPase Di-Ras modulates synaptic activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells*, 17, 778-789. (*Corresponding author)
doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01627.x.

⑧Kajiho, H., Fukushima, S., Kontani, K., Katada, T. (2012). RINL, guanine nucleotide exchange factor Rab5-subfamily, is involved in the EphA8-degradation pathway with odin. *PLoS One*, 7, e30575.
doi: 10.1371/journal.pone.0030575.

⑨Fukuyama, M., Sakuma, K., Park, R., Kasuga, H., Nagaya, R., Atsumi, Y., Shimomura, Y., Takahashi, S., Kajiho, H., Rougvie, A., Kontani, K., Katada, T. (2012). *C. elegans* AMPKs promote survival and arrest germline development during nutrient stress. *Biol. Open*, 1, 929-936.
doi: 10.1242/bio.2012836.

⑩Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K., Malhotra, V., and Katada, T. (2011). cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* 22, 2301-2308.
doi: 10.1091/mbc.E11-02-0143.

⑪Kajiho, H., Sakurai, K., Minoda, T., Yoshikawa, M., Nakagawa, S., Fukushima, S., Kontani, K., and Katada, T. (2011). Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the Rab5 subfamily GTPase Rab31. *J Biol Chem* 286, 24364-24373.
doi: 10.1074/jbc.M110.172445.

[学会発表] (計 19 件)

① Kontani, K., Sasaki, A., Hashimoto, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Katada, T. ARL8 mediates phagolysosome formation for apoptotic cell clearance in *C. elegans*. FASEB Summer Research Conferences: ARF and Rab family G Proteins. Oral Presentation, 2013 年 7 月 31 日 / Snowmass, アメリカ合衆国

② 紺谷 圈二、佐々木文佳、堅田利明. リソソ

ームへの物質輸送に介在する低分子量 G タンパク質 ARL8 (口頭発表) [第 8 回トランスポーター研究会; 2013 年 6 月 16 日 / 熊本県、熊本市 (熊本大学)]

③ 荻田佳孝、江上幸子、紺谷 圈二、堅田利明. 低分子量 G タンパク質 Di-Ras2 と SmgGDS の相互作用に関する生化学的解析 (ポスター発表・口頭発表) [第 86 回日本生化学会大会; 2013 年 9 月 12 日 / 神奈川県、横浜市 (パシフィコ横浜)] (鈴木紘一メモリアル賞受賞)

④ Keisuke Hashimoto, Maya Nagasawa, Fumiko Abe, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Kenji Kontani, Toshiaki Katada. ARL-8 GTPase functions in apoptotic cell removal by mediating phagolysosome formation in *C. elegans* (ポスター発表・口頭発表) [第 86 回日本生化学会大会; 2013 年 9 月 12-13 日 / 神奈川県、横浜市 (パシフィコ横浜)] (鈴木紘一メモリアル賞受賞)

⑤ 紺谷 圈二. リソソームへの物質輸送に介在する低分子量 G タンパク質 ARL8 (口頭発表) [細胞内ロジスティクス シンポジウム; 2013 年 9 月 18 日 / 兵庫県、淡路市 (淡路夢舞台国際会議場)]

⑥ 阿部 芙美子、紺谷 圈二、堅田 利明; Jurkat 細胞におけるマルチドメイン型 Rab ファミリー G 蛋白質 EFCAB4Ba の機能解析 (ポスター発表) [グローバル COE; 2012 年 2 月 4 日 / 大磯]

⑦ 堀 裕二、永島 慎一、武田 航典、紺谷 圈二、堅田 利明. 低分子量 G タンパク質 Arl13b の繊毛局在化におけるパルミトイル化修飾の役割 (ポスター発表) [グローバル COE; 2012 年 2 月 4 日 / 大磯]

⑧ 紺谷 圈二、永島 慎一、堀 裕次、堅田 利明. 繊毛形成・機能に介在する ARL ファミリー低分子量 G タンパク質の解析 (口頭発表) [第 3 回繊毛研究会; 2012 年 6 月 9 日 / 東京]

⑨ 紺谷 圈二、佐々木 文佳、長澤 茉耶、堅田 利明. アポトーシス細胞の除去に介在する低分子量 G タンパク質 ARL8 の機能解析 (口頭発表) [新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」第 4 回班会議; 2012 年 6 月 13 日 / 仙台]

⑩ 武田 航典、永島 慎一、堀 裕次、堅田 利明、紺谷 圈二. 繊毛局在性 Arf/Arl ファミリー G タンパク質 Arl13b の輸送機構の解析 (ポスター発表) [新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」第 4 回班会議; 2012 年 6 月 13 日 / 仙台]

⑪ 長澤 茉耶、佐々木 文佳、安藤 恵子、三谷 昌平、堅田 利明、紺谷 圈二. 線虫を用いた

リソソーム局在性低分子量 G タンパク質 Ar18 の機能解析 (ポスター発表) [新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」第 4 回班会議; 2012 年 6 月 14 日/仙台]

⑫荻田 佳孝、紺谷 圏二、堅田 利明. 低分子量 G 蛋白質 Di-Ras2 と SmgGDS が形成する複合体の生化学的解析 (ホスター発表) [新学術領域研究「構造細胞生物学」第 3 回班会議; 2012 年 7 月 13 日/箱根湯本]

⑬紺谷 圏二、荻田 佳孝、堅田 利明. アтипイカル Ras ファミリー G タンパク質 Di-Ras の機能解析 (口頭発表) [第 85 回日本生化学会大会; 2012 年 12 月 16 日/福岡]

⑭紺谷 圏二、堀 裕次、佐々木 文佳、永島 慎一、堅田 利明; Arf-like GTPase が介在する細胞内ロジスティクスと関連疾患 (口頭発表) [新学術領域「細胞内ロジスティクス」班会議; 2011 年 6 月 3 日/鳥羽]

⑮佐々木 文佳、安藤 恵子、三谷 昌平、堅田 利明、紺谷 圏二; アポトーシス細胞除去における低分子量 G 蛋白質 Ar18 の機能解析 (ポスター発表) [新学術領域「細胞内ロジスティクス」班会議; 2011 年 6 月 3 日/鳥羽]

⑯堀 裕次、永島 慎一、紺谷 圏二、堅田 利明. The ciliary small GTPase Arl13b (I): Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes intraflagellar transport. (ポスター発表) [第 63 回日本細胞生物学会大会; 2011 年 6 月 27 日/札幌]

⑰永島 慎一、堀 裕次、紺谷 圏二、堅田 利明. The ciliary small GTPase Arl13b (II): Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes intraflagellar transport. (ポスター発表) [第 63 回日本細胞生物学会大会; 2011 年 6 月 27 日/札幌]

⑱紺谷 圏二、佐々木 文佳、長澤 茉耶、安藤 恵子、三谷 昌平、堅田 利明; リソソームへの輸送における低分子量 G タンパク質 Ar18 の機能解析 (口頭発表) [第 84 回日本生化学会大会; 2011 年 9 月 24 日/京都]

⑲阿部 芙美子、新谷 真未、紺谷 圏二、堅田 利明. マルチドメイン型 Rab ファミリー G 蛋白質 EFCAB4Ba の機能解析 (口頭発表) [ファーマ・バイオフィオーラム 2011; 2011 年 10 月 8 日/仙台]

[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.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紺谷 圏二 (KONTANI KENJI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号: 30302615

(2) 研究分担者

福山 征光 (FUKUYAMA MASAMITSU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 20422389

齋藤 康太 (SAITO KOTA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 60549632

(3) 連携研究者

なし