

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790418
 研究課題名（和文）プリオンタンパクの小胞輸送に関与する RAB11 および SGSM ファミリーの機能解析
 研究課題名（英文）Function analysis of SGSM family and RAB11 which associate with the vesicular transportation of prion protein
 研究代表者
 楊 浩 (YANG HAO)
 慶應義塾大学・医学部・特任助教
 研究者番号：10464992

研究成果の概要（和文）：SGSM (Small G protein Signaling Modulator) ファミリータンパクは、プリオンタンパクの小胞輸送に関与する RAB11 タンパクと相互作用し、ヒトの遺伝性プリオン病の発症機序に関与することが考えられる。本研究では、様々な分子生物学的手法を用いて、SGSM ファミリーと RAB ファミリーとの相互作用を解析したところ、SGSM2 タンパクが RAB11 タンパクと相互作用することが明らかとなった。また、SGSM2 と相互作用する RAP タンパクの機能について解析したところ、RAP タンパクの活性化型がリサイクリングエンドソームからゴルジ装置までの細胞内逆行性輸送を制御することが分かった。

研究成果の概要（英文）：SGSM family proteins interact with RAB11 which regulates the vesicular transportation of prion protein, and might participate in the pathogenesis of hereditary prion disease. The association between SGSM family and RAB family was analyzed by molecular biological approaches and the results indicated that SGSM2 associates with RAB11. Furthermore, the function of RAP proteins was analyzed and it was proved that the GTP bound form of RAP proteins regulates the retrograde transportation from recycling endosomes to Golgi apparatus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：脳・神経、プリオンタンパク、SGSM ファミリータンパク

1. 研究開始当初の背景

プリオン病は正常プリオンが異常プリオンとなり、中枢神経系の細胞内に蓄積し、急速な神経細胞変性を起こす致死性疾患である。ヒトの遺伝性プリオン病は 20 番染色体

に存在するプリオン遺伝子の変異で作られた異常プリオンが中枢神経細胞に蓄積することにより発症する。致死性家族性不眠症はヒトの遺伝性プリオン病の一つであり、プリオン遺伝子の D178N 変異が原因である

(Goldfarb, L. G., *et al.*, *Science*, 1992)。最近、D178N 変異により作られた異常プリオンが神経細胞の ER および Golgi に蓄積し、GDP dissociation inhibitor α (GDI) を介して、RAB11 と相互作用し、細胞内小胞輸送に関与することが明らかとなった (Massignan, T., *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics*, 2010)。

申請者は RUN と TBC モチーフを併せ持つ SGSM1/2/3 遺伝子を発見し、これらの 3 遺伝子を SGSM ファミリーと命名した。ノーザンブロットおよび *in situ* hybridization の結果、SGSM ファミリーは中枢神経系のニューロンにおいて強く発現していた。さらに、SGSM タンパクが RAB ファミリーおよび RAP ファミリータンパクと相互作用することを明らかにした (Yang, H., *et al.*, *Genomics*, 2007)。これらの解析結果から、SGSM タンパクはシグナル伝達のメディエーターとして、ニューロンの RAP シグナル伝達経路からのシグナルにより RAB 小胞輸送経路を制御していることが推測できる。そこで、SGSM ファミリータンパクが RAP を介したシグナル伝達経路および RAB11 を介した小胞輸送経路との相互作用により、神経細胞内の異常プリオンの輸送を制御し、ヒトの遺伝性プリオン病の発症機序に関与することが予想された。

2. 研究の目的

神経細胞内におけるプリオンタンパクの輸送にはシグナル伝達経路と小胞輸送経路との相互作用が必要だと考えられる。SGSM タンパクは RUN および TBC モチーフを介して、RAP および RAB タンパクと相互作用するが、この相互作用とプリオンタンパクの小胞輸送との関連はまだ不明である。SGSM ファミリータンパクと RAB11 を含む RAB ファミリータンパクおよび RAP ファミリータンパクとの相互作用を確認する必要がある。本研究はプリオンタンパクの小胞輸送に関与する RAB11、RAP タンパクおよび SGSM タンパクの制御作用を解析することにより、異常プリオンの細胞内蓄積の原因および遺伝性プリオン病の発

症機序を探究する。

3. 研究の方法

(1) ヒトの SGSM2 タンパクの推定アミノ酸配列を解析し、強い抗原性かつマウス *Sgsm2* タンパクの推定アミノ酸配列との高い相同性 (>80%) を示した部分のペプチドを合成し、ウサギを免疫して、血清から抗 SGSM2 抗体を精製した。ウサギ抗 SGSM2 抗体および市販のマウス抗 RAB タンパク抗体 (RAB3/4/5/6/7/8/9/11/24/27/31) を用いて、COS7 細胞において、共免疫染色を行い、SGSM2 および RAB タンパクの細胞内局在を同定した。

(2) 従来の方法と比べて、mammalian 2-hybrid 法はある程度の定量性があるため、mammalian 2-hybrid 法を用いて、SGSM2 タンパクと RAB タンパクとの相互作用を解析した。文献情報に基づいて、最も SGSM タンパクに関連しそうな数種類の RAB メンバーを選び、これらの RAB メンバーおよび SGSM2 の ORF (Open Reading Frame) を PCR で増幅してから、RAB の ORF を pBIND ベクターに、SGSM2 の ORF を pACT ベクターに挿入した。COS7 細胞に上記の発現ベクターを導入し、SGSM タンパクおよび RAB タンパクを一過性に共発現させ、両タンパク間の相互作用の結果として発現したルシフェラーゼの活性を測定した。測定結果を比較することにより、SGSM2 タンパクと各 RAB タンパクとの相互作用の強弱を評価した。

(3) RAP1A/2A の ORF をクローニングし、遺伝子工学の手法により、これらのタンパクの活性化型 (G12V) の変異体をコードする cDNA を作製し、HA タグを付加できるベクターに挿入した。これらの変異体を強制発現させてから、蛍光標識したコレラ毒素を用いて、エンドサイトーシスアッセイを行った。

4. 研究成果

抗 SGSM2 抗体およびマウス抗 RAB タンパク抗体 (RAB3/4/5/6/7/8/9/11/24/27/31) を用

いて、細胞免疫染色を行ったところ、内在性の SGSM2 タンパクが内在性の RAB11 タンパクと部分的に共局在し (図 1)、ほかの RAB タンパクと共局在しないことが分かった。また、2次元の画像により同定された SGSM2 タンパクと RAB11 タンパクとの部分的な共局在のシグナル (図 1 の矢尻 1) を、これとは別の二方向からの 3次元解析でも確認した (図 1 の矢尻 2 および矢尻 3)。

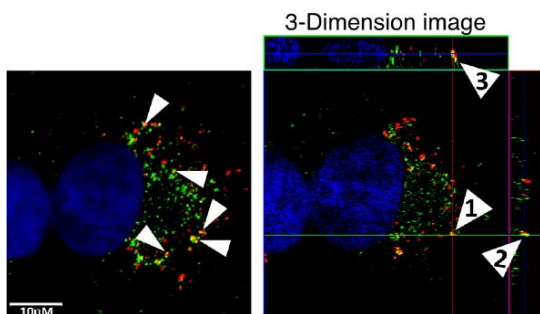


図 1

Red: SGSM2

Green: RAB11

Blue: DAPI

RAB6 および RAB9 もリサイクリングエンドソーム関連の細胞内小胞輸送に関与するが、細胞免疫染色を行った結果、SGSM2 と RAB6 (図 2) あるいは RAB9 (図 3) との共局在シグナルが確認されなかった。

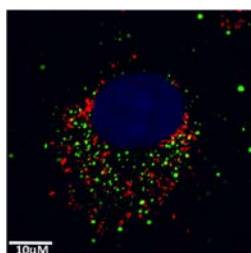


図 2

Red: SGSM2

Green: RAB6

Blue: DAPI

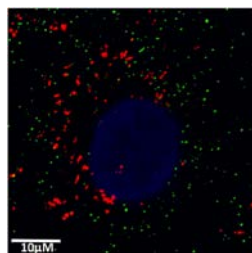


図 3

Red: SGSM2

Green: RAB9

Blue: DAPI

また、Mammalian 2-hybrid 法を用いて、SGSM2 タンパクと数種類の RAB ファミリータ

ンパクとの相互作用について調べた。その結果、SGSM2 がいくつかの RAB ファミリーメンバーと結合し、中でも RAB11 と最も強く結合するなど、ある程度の特異性を持つことが分かった (図 4)。

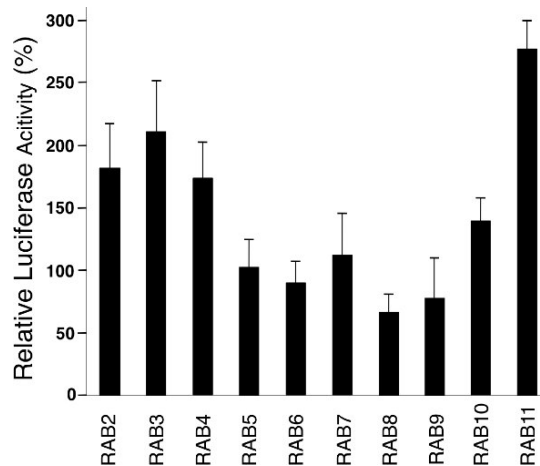


図 4 Mammalian 2-hybrid 法を用いた SGSM2 タンパクと RAB タンパクとの相互作用解析。縦棒: 両タンパク間の相互作用により発現したルシフェラーゼの活性がネガティブコントロールとした空ベクターの測定結果に対するパーセンテージ。

SGSM2 タンパクが RAP ファミリータンパクと相互作用することがすでに報告された。ヒト RAP1A および RAP2A タンパクについて、HA タグ付加した GTP 結合型の変異体を作成し、COS7 細胞で強制発現させてから、蛍光標識したコレラ毒素 (CTxB) を用いて、エンドサイトーシスアッセイを行った。その結果、RAP タンパクの活性型変異体を強制発現させた細胞では、コレラ毒素のエンドソームからゴルジ装置への輸送が阻害された (図 5 矢尻)。この結果から、SGSM2 が RAP ファミリータンパクと相互作用し、エンドソームからゴルジ装置までの逆行性輸送に関与する可能性が示唆された。

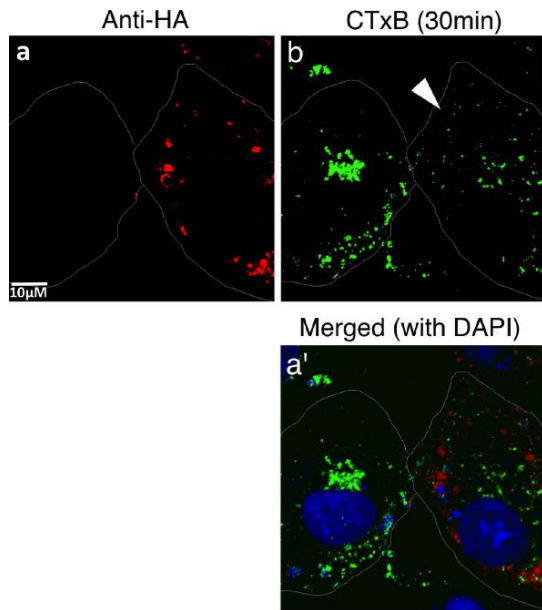


図 5

- a: 抗 HA 抗体による RAP1A の活性化型変異体 (Red) の検出
 b: 蛍光標識したコレラ毒素 (CTxB: Green)
 a': a, b と DAPI 染色 (Blue) を重ねあわせたもの

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

① 楊 浩、SGSM2 タンパクは RAB11 と協調してクラスリン被覆小胞による細胞内逆行性輸送を制御する、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日～16 日、横浜

② 楊 浩、SGSM2 タンパクは RAB11 と協調してクラスリン被覆小胞による細胞内逆行性輸送を制御する、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楊 浩 (YANG HAO)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：10464992