

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790224

研究課題名(和文) 神経ペプチドの調節性分泌経路の素過程における Rab3 / 27 の機能実体

研究課題名(英文) Mechanism of regulated exocytosis of neuropeptides by Rab3/27

## 研究代表者

小幡 裕希 (Yuuki, Obata)

東京理科大学・生命医科学研究所・助教

研究者番号：20609408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：RabファミリーGタンパク質は細胞の生存や機能維持に不可欠な膜輸送を制御している。中でもRab3とRab27は分泌型の調節性エキソサイトーシス制御の中心分子である。しかし、その分子機構については、Rab3やRab27の活性変化が膜融合のどのタイミングで起きるのかという決定的に重要な情報が欠けているために、その機能は不明の点が多い。本研究では新たにRab3とRab27のバイオセンサーを開発した。Rab3センサーとRab27センサーのダイナミックレンジはそれぞれ73.0%と106.3%であり、細胞イメージングに使用できる目安の数字を十分超えている。これらのセンサーを使用していくつかの新知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Rab-family G proteins control membrane traffic which is essential for cell survival and function. In particular, Rab3 and Rab27 are critical factors for regulated-exocytosis which is used for secretion. However, the mechanism which regulates Rab3/Rab27 activities is largely unknown, because we have very little information about when and where the activity of Rab3 or Rab27 changes during the process of membrane fusion. In this study, we newly developed FRET sensors for Rab3 and Rab27. The dynamic range of Rab3 sensor is 73.0%. The dynamic range of Rab27 sensor is 106.3%. Both dynamic ranges are larger than the minimum criteria for cellular FRET imaging. We obtained some novel findings using these FRET sensors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：Rab GTPase Rab3 Rab27 エキソサイトーシス エンドサイトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

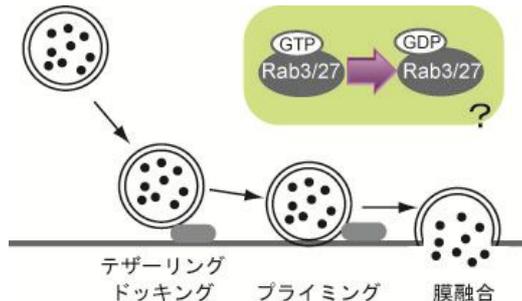
細胞は様々な膜系により構成されており、それらが小胞輸送を介して物質と情報の交換を行なって生命活動を維持し、神経や免疫などの高次機能を支えている。従って小胞輸送システムが破綻することで種々の疾患が生じてくる。RabファミリーG蛋白質は小胞輸送制御の中心分子であり、哺乳動物細胞にはおよそ60個のメンバーが存在する。そのうち、分泌型の調節性エキソサイトーシスを主に担うのは、Rab3とRab27で代表されるサブグループである。Rab3は、主にシナプスでの神経伝達物質の放出の正確な調整を行っていると考えられており、Rab3aのノックアウトマウスでは海馬CA3領域での長期増強が誘導されなくなる。さらに、Rab3の不活性化因子Rab3-GAPの変異により精神遅滞を伴う遺伝性疾患が生じるばかりでなく、アルツハイマー患者のシナプス前部でRab3Aの量が大きく減少していることが報告されている。また、主に内分泌系におけるホルモンの分泌型エキソサイトーシスを制御するRab27の変異により、毛髪の部分白化や免疫疾患を主症状とするGriscelli症候群が発症するほか、Rab27の関連分子について神経疾患や免疫疾患との関わりが相次いで報告されている。

では、Rab3とRab27の調節性エキソサイトーシスにおける役割は何であろうか。この問題については数多くの研究が行なわれているが、正確な機能はまだ未解明である。Rabファミリーを含めて低分子量G蛋白質の本質は、上流からシグナルを受け取って自身の状態を変え下流にシグナルを流すという「分子スイッチ」であり、Rab3とRab27についても、その活性変化がエキソサイトーシスとカップルしていると考えられている。ところが活性が上がるのか下がるのか、特に、活性変化が膜融合の直前に起きるのか、最中に起きるのか、後に起きるのかという重要なポイントが不明である(右上図)。そのために、Rab3とRab27がテザーリング、ドッキング、プライミング、膜融合のどこで働いているかがまだ

十分に解明されていない。特に、SNARE複合体やSM蛋白質のダイナミズムとの関連性はブラックボックスのままである。

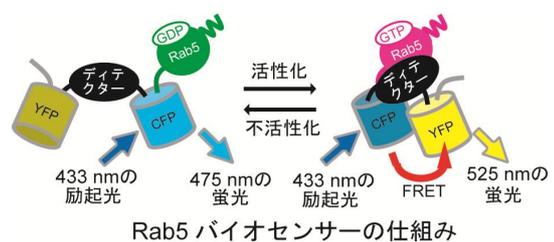
## 2. 研究の目的

私が所属する研究室では、蛍光共鳴エネルギー



Rab3/27はどこで活性変化するのか

ギー移動(FRET)の原理に基づくバイオセンサー(下図)を作製して、G蛋白質の活性やイノシトールリン脂質濃度の局所的な変化を生きた細胞で検出するFRETイメージング技術の開発を



Rab5バイオセンサーの仕組み

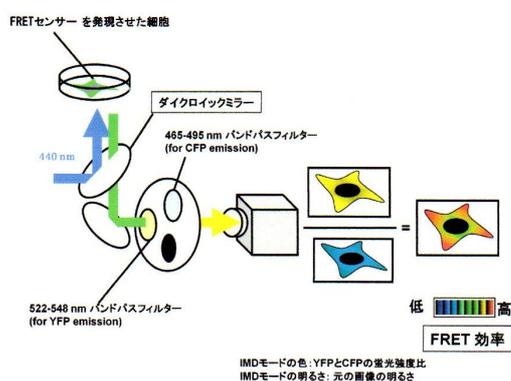
行なっている。研究室では、FRETイメージングによる局所活性の可視化には小胞輸送研究の新局面を切り開く力があるという考えのもとに、2つのキーテクノロジーを開発している。まず、従来開発してきたFRETセンサーの構造を根本から見直して、Rab分子のセンサーの基本デザインを確立し、さらにその改良を続けている。また、膜融合の研究に特に有用な全反射蛍光顕微鏡を使った高速FRETイメージング法を初期に報告し、エキソサイトーシスに関わるG蛋白質TC10のFRETセンサーを使って、TC10の不活性化が膜融合の0.2秒前に起きていることを突き止めた。これらの背景のもとに、Rab3とRab27の活性変化を可視化するFRETセンサーを開発することを目的として本研究を行った。

## 3. 研究の方法

本研究では、細胞内の分子活性を生きた細胞

でモニターできる FRET センサーを使用し、各種の先端技術と組み合わせて使用した。

FRET イメージングの流れは下図のようになる。FRET イメージングを行う機器は倒立型蛍光顕微鏡、CCD カメラ、フィルターチェンジャーとそれらを制御するコンピュータからなる。75W キセノンランプを光源として使用し、CFP を励起するために 440 nm のバンドパスフィルターを通す。蛍光画像は CFP 用エミッションフィルターを 1 枚、YFP 用エミッションフィルターを 1 枚の計 2 枚の画像を CCD カメラで撮影する。

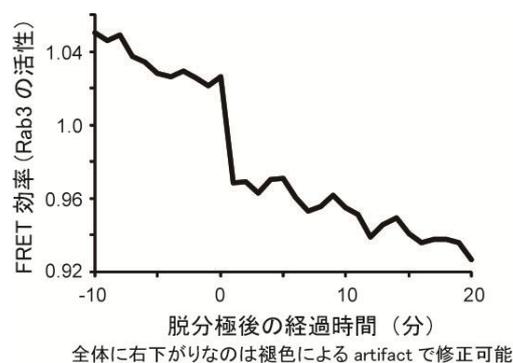


#### 4. 研究成果

(1) 調節性エキソサイトーシスにおける Rab3 の機能解析を目的とし、FRET センサーの開発を行った。Rab5 センサーの基本デザインをもとに、Rab3 とその標的分子、および黄色蛍光蛋白質、シアン色蛍光蛋白質からなる FRET センサー候補を多数作製した。これらの中から、□細胞内分布が本来の Rab3 に近いもの、□活性化に伴う FRET 効率の上昇の最も高いもの、□シグナルノイズ比が高いもの、を指標にセンサーを選択して、十分に大きなダイナミックレンジを持つ Rab3 の FRET センサーを作製することができた。このセンサーのダイナミックレンジは 73.0% であり、既発表の低分子量 G 蛋白質の FRET センサーの大部分を上回る高性能センサーである。

また、細胞膜に局在化する Rab3 センサーを発現させた PC12 細胞を脱分極させると、1 分以内に FRET 効率 (Rab3 の活性と比例する) が 4% 低下した。また、その後の 60 分間はその低下し

た FRET 効率のレベルが維持されていた。このことは、細胞膜直下の Rab3-positive vesicle 上の Rab3 活性が、脱分極刺激後速やかに低下することを意味している。同様の活性低下は、本来の Rab3 と同じ細胞内局在を示す Rab3 センサーでも確認できた。これは、 $Ca^{2+}$  流入により Rab3 活性が速やかに低下することを示唆している。



(2) 調節性エキソサイトーシスにおける Rab27A の機能解析を目的とし、FRET センサーの開発を行った。FRET バイオセンサーは、YFP (YPet-M), Rab-binding domain (RBD), extensive variable linker (EV linker), CFP (SECFP), Rab27 から構成される改良型 Raichu を基本構造にした。

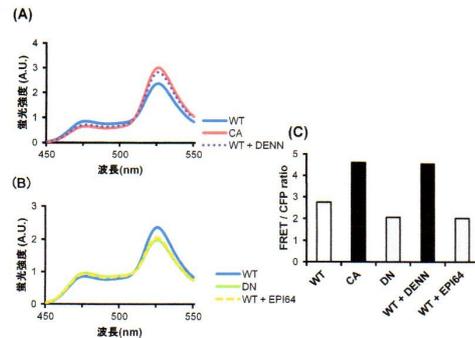
本開発の以前に種々の Rab27 エフェクターを用いた試作を行っており、その結果を踏まえて、Rab27A 結合蛋白質の中から Slac2a, Slac2c, Slp4a を選び、Rab27 結合領域である Synaptotagmin-like protein homology domain (SHD) を Rab27 センサーの開発に用いた。また、Rab27A センサーの Rab27A 部分が活性化した時および不活性化した時の FRET / CFP 比を求めるために、Rab27A 部分を恒常活性化型変異体と優性劣性型変異体に置換したセンサーをそれぞれ構築した。

試作した Raichu-Rab27A の性能検討として、まず分光蛍光光度計を用いた蛍光プロファイルの取得を試みた。浮遊状態に維持した 293F 細胞にセンサー候補を発現させ、48 時間後に細胞に 433 nm の波長の光を照射し、蛍光スペクト

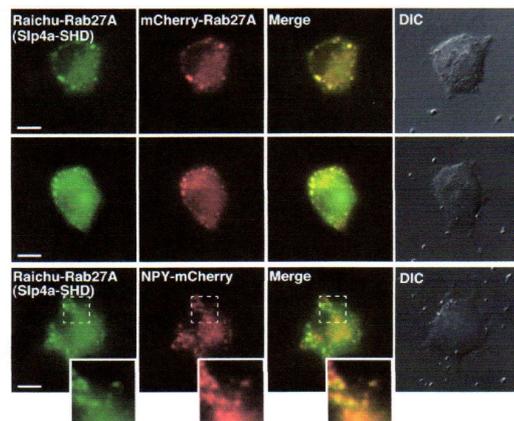
ルを測定した。CFP から YFP にどれだけ無放射的なエネルギー移動が起きているかを示す FRET / CFP 比は、YFP の最大波長 525 nm の蛍光強度を CFP の最大波長 475 nm の蛍光強度で割った値を使用した。ダイナミックレンジは、恒常活性型 Rab27A と優性劣性型 Rab27A の間でどれだけ FRET / CFP 比が離れているかを示す値である。これが 30%を超えることが細胞イメージングに使用できる基準のひとつである。Raichu-Rab27A (Slac2a-SHD), Raichu-Rab27A (Slac2a-SHD), Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) のダイナミックレンジは、それぞれ 73.1%, 8.5%, 106.3% だった。Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) は、ダイナミックレンジ 106.3% と十分に大きく、Rab27A のバイオセンサーとして期待できるので、さらにこのセンサー候補の性能検討をおこなうこととした。一方、Raichu-Rab27A (Slac2c-SHD) は、ダイナミックレンジ 8.5% と低く、Rab27A センサーの候補から外した。また、Raichu-Rab27A (Slac2a-SHD) は、恒常活性型 Rab27A のセンサーの FRET / CFP 比が優性劣性型 Rab27A の FRET / CFP 比より低く、予想される作動様式と逆である。ただし、このセンサーは、Rab27A が活性化した時に FRET / CFP 比が低下するセンサーとして利用できる可能性があるため、こちらにもさらに性能を行った。

低分子量 G 蛋白質は、GEF による活性化と GAP による不活性化を受ける。Rab27A も GEF および GAP による活性調節を受けていると考えられている。Rab27A の GEF は、哺乳類などの高等生物では不明であるが、線虫では AEX-3 が同定されており、AEX-3 は DENN (differentially expressed normal and neoplastic cells) の ortholog であることが報告されている。また、Rab27 の GAP として EPI64 が同定されている。そこで、Raichu-Rab27A が生理的な活性化因子および不活性化因子の調節を受けるかどうかを検討するために、Raichu-Rab27A の FRET / CFP 比の DENN または EPI64 の発現による変化を調べた。293F 細胞に

Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) と DENN を共発現させたところ、恒常活性型 Rab27A のセンサーと同等まで FRET / CFP 比が上昇した (下図)。一方、EPI64 を共発現させたところ、優性劣性型 Rab27A のセンサーと同等まで FRET / CFP 比が低下した (下図)。この結果は、Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) が、GEF 及び GAP に応答していることを示唆している。



以上のように、Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) は、106.3% とダイナミックレンジが大きく、GEF および GAP への応答も観察されることから、Rab27A のバイオセンサーとして大変有望である。そこで次に、Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD)



が Rab27A 本来の局在を示すかどうかを調べた。ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞では、Rab27A は、ペプチドホルモンなどの分泌に使用される有芯小胞に局在し、調節性エキソサイトーシスで働いている。そこで、PC12 細胞に Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) と monomeric Cherry を融合させた Rab27A または neuropeptide Y (mCherry-Rab27A または

NPY-mCherry) を共発現させ、蛍光顕微鏡でそれらの局在を観察した。Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) は、細胞膜近傍の有芯小胞と細胞質への局在が見られ、この局在は mCherry-Rab27A と一致していた (下図)。さらに、Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) が局在する小胞が有芯小胞かを調べるために NPY-mCherry と共発現させたところ、NPY-mCherry 陽性の有芯小胞に Raichu-Rab27A (Slp4a-SHD) が局在した。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小幡裕希

東京理科大学 生命医科学研究所 助教

研究者番号: 20609408