

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650018

研究課題名(和文)人工脂質膜を用いたRabの膜局在機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of Rab membrane insertion mechanism using artificial membranes

研究代表者

伊藤 桜子 (ITO, Sakurako)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：60597152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTPaseであるRabファミリータンパク質は、膜系表面に局在して各膜系の属性を示す。Rabは細胞質中でRabGDIと結合している。各膜系に応じて、適切なRabが、Rab-RabGDI複合体から解離されて膜に埋め込まれる。

本研究では、Yipファミリー膜タンパク質によるRabの膜挿入機構を人工脂質膜上に再構築することを目指した。まず、Yipを含むリポソームとRab-RabGDI複合体の調製方法を確立した。また、近年、複数のRabGEFが膜挿入活性を持つことが示されたので、数種類のRabGEFの調製方法も確立した。今後はこれらを用いてRabの膜挿入系の再構築を目指す。

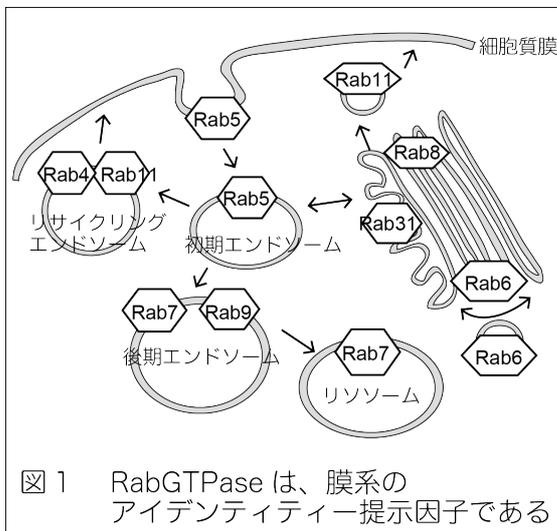
研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, Rab family small GTPases present the identity of each membrane fractions. Rab forms a complex with RabGDI in cytosol, and when necessary, appropriate Rab needs to be detached from RabGDI and inserted into the membrane. In this study, we have tried to reconstruct the Rab insertion system on the artificial membrane. Yip family transmembrane proteins and RabGEFs are proposed to function in the Rab insertion system. We have successfully prepared these components, which is necessary for the reconstruction of the Rab insertion system.

研究分野：X線結晶構造解析

キーワード：Rab 膜 GEF

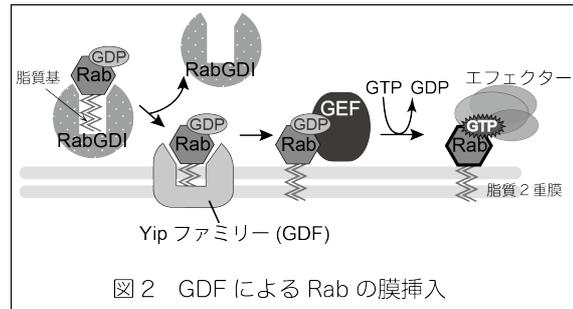
1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内では、脂質膜に仕切られた多くの膜系が存在する。各膜系の内部では各々に特有の反応が行われている。膜系は互いに芽・融合を繰り返しており、生体物質は膜系間を移動しながら必要なプロセッシングを受けている。流動的に変化する膜系のアイデンティティーを示す目印として機能しているのが低分子量 GTPase である Rab ファミリータンパク質である。Rab ファミリーはヒトで約 70 種も同定されており、これらが複数の組み合わせで膜上に配置されることによって、各膜系はアイデンティティーを示している (図 1)。



Rab は自身の C 末端に付加された脂質基を細胞膜に挿入して膜表面に局在する (図 2)。GDP 結合不活性型 Rab は、脂質基をグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (RabGDI) に結合させて、細胞質中で可溶性タンパク質複合体として安定に存在している。膜系が新たに構築されたり、別の膜系から変化したりする際には、各膜系に応じて必要な Rab を細胞質中の Rab-RabGDI 複合体から見つけ出し、RabGDI から解離させて膜に埋め込むことが必要になる。Rab は膜挿入された後、グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) によって GTP 結合活性型 Rab になり、下流の Rab エフェクターをリクルートして各膜系に特有の反応を引き起こす。2003 年に、膜タンパク質である

Yip ファミリータンパク質が、RabGDI から Rab を解離させて膜上に挿入する GDI 置換因子 (GDF) としての機能を持つと提唱されたが、具体的な反応機構は未知である。また、Yip によって膜に挿入されることが示されたのは、60 種類以上の Rab のうちの一部のみであり、他の Rab がどのようにして膜に挿入されているかということも未解明である。



2. 研究の目的

本研究は、Yip が Rab を膜系表面に挿入する反応系を人工脂質膜上に再構築することを目的に行われた。反応系を再構築することができたら、更に Rab の活性化因子やリサイクル因子など、下流の様々な因子を系に加えることで、細胞における Rab 局在の全体的な制御機構の解明につながると期待できる。

まずは、Yip ファミリーが、対応する Rab を膜挿入する機構の解明を目指した。ヒトで 16 種類同定されている Yip ファミリータンパク質が、60 種以上の Rab をどのように認識しているのかということにはわかっていない。人工脂質膜上に再構築した反応系を用いれば、Yip と Rab を網羅的に調製することによって両者の対応を解明することができる。

また、脂質化 Rab と GDI の結合は強固であることが知られており、その強固な結合を Yip がどのように解離させて Rab を膜挿入するのかという機械的な側面も興味深い。本研究では、表面プラズモン共鳴法を用いた反応速度論的解析を行い、反応機構を理解することを目指した。

3. 研究の方法

人工脂質膜系上に、Yip ファミリータンパク質を埋め込み、そこに Rab 局在に関わる種々の因子を作用させることによって、細胞内における Rab の膜への局在反応系を再構築することを目指した。

これまでに行われた Yip による Rab の膜挿入活性測定は、Rab が膜に挿入された後の GEF 活性を測定するという間接的な方法が殆どである。そこで、生体内の脂質 2 重膜を模した人工的な脂質膜系を用いた活性測定系を構築し、脂質環境下で Rab の膜挿入反応自体を観察することを目指した。これらの脂質系では、露出部が全て親水性になるため、溶媒に界面活性剤を加える必要がなく、生体内に類似した環境での解析が可能になる。

膜挿入反応の検出方法は以下のように予定していた。プロテオリポソームを表面プラズモン共鳴法で用いるセンサーチップ上に固定し、その上に各因子を反応させることによって、センサーチップ上に固定されたプロテオリポソームの重量変化として Rab の膜挿入を検出することができる。

4. 研究成果

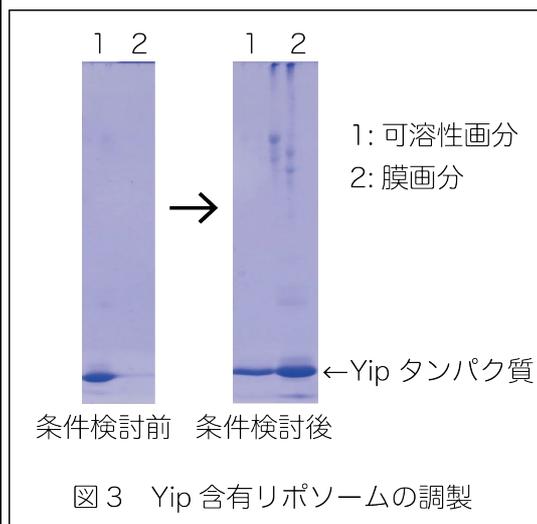
まずは、反応系に関わる各因子を調製した。

(1) Yip の調製

まず、Yip タンパク質を調製した。Yip タンパク質は 4 回膜貫通型タンパク質である。Yip は、昆虫細胞を用いた発現系で大量発現させた。回収した細胞から膜画分を精製し、界面活性剤を用いて膜画分から膜タンパク質を抽出した。その後、アフィニティカラムとゲルろ過カラムを用いて精製した。

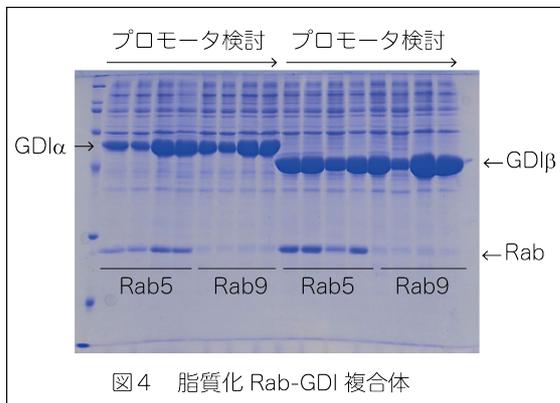
続いて、Yip を高濃度で含むプロテオリポソームを合成するための条件検討を行った。試験管内における Yip の脂質膜への取り込み効

率は非常に悪く、大部分が可溶性画分に移行してしまった。そこで、脂質の種類や割合を検討して、Yip が高濃度でリポソームに取り込まれる条件を見出した (図 3)。



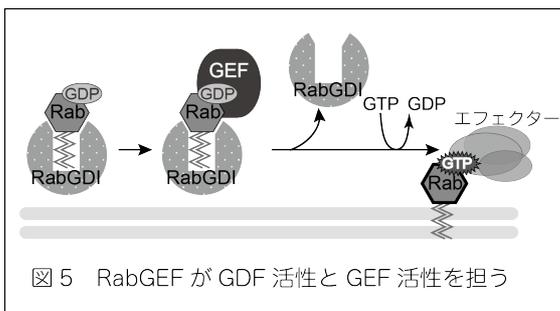
(2) 脂質化 Rab の調製

C 末端に脂質基を付加した Rab と RabGDI の複合体の調製方法を検討した。計画当初は、プロテインライゲーション法を応用して、合成した脂質化ペプチド由来の脂質基を Rab の C 末端に試験管内で付加する方法を用いていた。この方法でも、脂質化 Rab と GDI の複合体を調製することに成功していたが、再現性が悪かった。また、生体内では Rab には 2 つの脂質基が付加されているが、上記の方法では脂質基を 2 つ付加した Rab を調製することが難しかった。そこで、昆虫細胞内で Rab と GDI を共発現させることによって、昆虫細胞内在のシステムを使って脂質基付加された Rab が、細胞内で GDI と複合体を形成する方法を検討した。発現プロモーター、Rab の種類、GDI のアイソフォームなどを検討し、図 4 に示すように Rab-GDI 複合体を調製することに成功した。



(3) 各因子の調製に時間がかかってしまったため、今回は膜挿入反応の検出まで至らなかった。そこで今後は、Yip を含むプロテオリポソームをセンサーチップに固定し、流路に供給する Rab-GDI 複合体から Rab が引き抜かれるかどうかを、表面プラズモン共鳴法で検出する。

(4) 本研究遂行期間中に、各 Rab に対応する Rab グアニンヌクレオチド交換因子 (RabGEF) が、Rab の活性化と膜挿入を同時に行う機能を持つという研究が発表された (図5)。



そこで、GDF 活性があると提唱されている RabGEF について、調製方法の検討を行った。発現システムやコンストラクト等の改良を経て安定に調製することに成功した。また、調製した RabGEF が、GEF 活性を持つことを確認した。今後は、リポソームを固定したセンサーチップに、Rab-GDI 複合体と RabGEF を作用させることによって、Rab がリポソームに移行するかどうかを解析したい。

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6件)

1. Structural basis for methyl-donor-dependent and sequence-specific binding to tRNA substrates by knotted methyltransferase TrmD.
Ito T, Masuda I, Yoshida K, Goto-Ito S, Sekine S, Suh SW, Hou YM, Yokoyama S. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Aug 4;112(31):E4197-205. doi: 10.1073/pnas.1422981112. 査読あり
2. Structure of Slitrk2-PTP complex reveals mechanisms for splicing-dependent trans-synaptic adhesion.
Yamagata A, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shirosima T, Yoshida T, Fukai S. Sci Rep. 2015 May 19;5:9686. doi: 10.1038/srep09686. 査読あり
3. Mechanisms of splicing-dependent trans-synaptic adhesion by PTP -IL1RAPL1/IL-1RACp for synaptic differentiation.
Yamagata A, Yoshida T, Sato Y, Goto-Ito S, Uemura T, Maeda A, Shirosima T, Iwasawa-Okamoto S, Mori H, Mishina M, Fukai S. Nat Commun. 2015 Apr 24;6:6926. doi: 10.1038/ncomms7926. 査読あり
4. Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20.
Toma A, Takahashi TS, Sato Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Nakada S, Fukuto A, Horikoshi Y, Tashiro S, Fukai S.

PLoS One. 2015 Mar 23;10(3):e0120887.

doi: 10.1371/journal.pone.0120887.

eCollection 2015. 査読あり

5. Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity.
Sato Y, Goto E, Shibata Y, Kubota Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Kubota K, Inoue J, Takekawa M, Tokunaga F, Fukai S.
Nat Struct Mol Biol. 2015 Mar;22(3):222-9. doi: 10.1038/nsmb.2970. 査読あり
6. Crystallographic and mutational studies on the tRNA thiouridine synthetase TtuA.
Nakagawa H, Kuratani M, Goto-Ito S, Ito T, Katsura K, Terada T, Shirouzu M, Sekine S, Shigi N, Yokoyama S.
Proteins. 2013 Jul;81(7):1232-44. doi: 10.1002/prot.24273. 査読あり

[学会発表](計0件)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 桜子 (Sakurako ITO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号: 60597152