

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03669

研究課題名(和文) 低分子量GTPase Rabとその新規GDP/GTP交換因子ファミリーの機能解明

研究課題名(英文) Functional analyses of small GTPase Rab proteins and their novel guanine nucleotide exchange factors

研究代表者

佐藤 健 (Sato, Ken)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：30311343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTPaseであるRab11はゴルジ体やエンドソーム等に局在し、細胞膜タンパク質のリサイクリング、細胞移動等の生命にとって重要な役割を担っており、卵巣ガンや乳ガン等の重篤な疾患との関連も示唆されている。本研究では、まず我々が発見したRab11のGDP/GTP交換因子、REI-1/SH3BP5ファミリーがRab11を活性化する分子メカニズムについて結晶構造解析により解明した。また、哺乳類培養細胞においてSH3BP5、SH3BP5Lの機能解析を行い、これらがリサイクリングエンドソームに局在し、インテグリン等の細胞内輸送を制御することにより細胞移動を調節していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、既知のRab GDP/GTP交換因子とは異なるアミノ酸配列を持つREI-1/SH3BP5ファミリータンパク質がどのようにしてRab11を活性化するのか明らかとなった。この発見は60種以上存在するRabタンパク質の活性化機構に新たな知見を与えるものであり、学術的意義が高いと言える。また、これらの因子がRab11の活性化を通じてガン細胞等の細胞移動を制御していることが明らかとなった。Rab11は生物にとって必須であり阻害することは困難であるが、REI-1/SH3BP5タンパク質はRab11が関連するガン等の治療薬開発の新たな標的分子となる可能性があり、社会的にも意義があると言える。

研究成果の概要(英文)：Rab11, which is a small GTPase, is localized in the Golgi apparatus and endosomes, and plays important roles such as endocytic recycling of cell membrane proteins and cell migration. Rab11 is also suggested to be associated with serious diseases such as ovarian cancer and breast cancer. In this study, we first clarified the molecular mechanism by which the Rab11 GDP / GTP exchange factor, REI-1 / SH3BP5 family, activates Rab11 by crystal structure analysis. In addition, we performed functional analysis of SH3BP5 and SH3BP5L in cultured mammalian cells and found that they localized to recycling endosomes and regulate cell migration by controlling intracellular trafficking of integrins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低分子量GTPase GDP/GTP交換因子 エンドサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTPase である Rab ファミリータンパク質 (以後 Rab) はヒトでは 60 種類以上存在し、主に細胞内における物質輸送やオルガネラの移動、融合等に関与することが知られている (Fukuda, Cell Mol Life Sci. 2008). これらは GDP と GTP の変換により分子スイッチのように働き、GTP 型に変換されるとエフェクター分子を介して様々な生理機能を発揮する。この GDP/GTP サイクルは 2 種の制御因子によって調節されている。このうち GDP/GTP 交換因子 (以後、GEF) は Rab に結合している GDP を GTP に変換し、Rab の活性化に働く。一方、GTPase 活性化因子 (GAP) は Rab による GTP 加水分解を促進し Rab の機能をオフにする。多くの Rab のうち、Rab11 はゴルジ体やエンドソーム等に局在し、細胞膜タンパク質のリサイクリング、分泌、細胞の移動や伸長、細胞分裂等の生命にとって非常に重要な役割を担っている。ヒトの Rab11 は 3 種類 (Rab11A, Rab11B, Rab11C (Rab25)) 存在することが報告されており、Rab11A, Rab11B に関しては、アルツハイマー病の 1 つの原因である アミロイドの産生に働くことが報告されている。また、Rab11C (Rab25) に関しては、卵巣ガンや乳ガンにおいて高発現しており、この因子が細胞表面にある  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンを活発にリサイクリングさせることによって細胞移動を促進し、ガン細胞の転移に関与すると考えられている (Bhuin & Roy, IJMCM, 2015)。このように Rab11 は非常に多様な機能を持つことが示唆されてきているが、なぜ単一の分子が生体内においてこれほど多くの機能を使い分けることができるのかについてはほとんど明らかとなっていなかった。特に多様な組織を持つ動物個体においては各細胞の状況に応じて適材適所に Rab を活性化し、異なる機能を発揮させる必要があると考えられる。つまり、いつどこで Rab を活性化するかがきわめて重要である。そのキープレイヤーとなりえるのが Rab11 を活性化する GEF であるが、Rab11 GAP や Rab11 が作用するエフェクター分子に関しては知見があるのに対し、Rab11 GEF は長年不明であった。そこで我々は、この Rab の活性を時空間的に制御する分子機構を明らかにするために Rab11 に結合する因子を探索したところ、線虫からヒトまで保存された Rab11 GEF 活性を持つ新規因子 REI-1 (Rab Eleven Interacting protein-1) を発見した (Sakaguchi et al, Dev. Cell, 2015)。この REI-1 とそのホモログである SH3BP5, SH3BP5L は SH3BP5 (SH3-binding protein 5) ドメインや Btk (Bruton's Tyr Kinase)-binding motif を持つが、既知の Rab GEF に存在する Vps9 ドメインや DENN ドメインは持っておらず、どのようにして Rab11 に作用して GDP/GTP 交換反応を起こすのか、不明であった。また、これらの哺乳類における生理機能もまったく明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究ではまず REI/SH3BP5 ファミリーが特異的に作用する Rab タンパク質の同定、そして Rab11 と REI/SH3BP5 ファミリーの結晶構造解析を行うことにより、この新たな Rab GEF ファミリーの作用機序について分子レベルで解明することを目指した。また、線虫および哺乳類における Rab11 GEF の生理機能の解析を通じて、細胞環境に応じて Rab11 の活性を時空間的に制御する分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では申請者らが発見した新規 Rab GEF である REI/SH3BP5 ファミリーについて生化学的手法と線虫・マウスといった動物モデルを駆使して研究を行った。まず REI-1 等が特異的に作用する Rab を探索し、これらの Rab に対する GEF 活性について解析した。また、REI-1 等の脂質

結合性についても検討した。さらに、REI-1・Rab11 複合体の結晶構造解析を行い、その作用機序の解明を試みた。また、線虫において REI-1 を活性化する上流因子や関連因子を酵母ツーハイブリッド法等で探索し、その機能解析を行った。さらに、哺乳類ホモログである SH3BP5 等の細胞内機能を解析するとともにノックアウトマウスの作製・解析を試み、動物個体における生理機能の解明を目指した。

#### 4. 研究成果

まず低分子量 GTPase Rab11 の新規 GDP/GTP 交換因子 (GEF) 候補である SH3BP5 及び SH3BP5L について解析を行った。これらのタンパク質を精製し、ヒトにおいて 3 種類存在する Rab11 のアイソフォーム (Rab11a, Rab11b, Rab25) に対する GEF 活性を測定した。その結果、SH3BP5 及び SH3BP5L とともにこれらすべてに対して強い GEF 活性を示すことが明らかとなった。次に、SH3BP5/SH3BP5L の細胞内局在性について、GFP 融合タンパク質を発現させた HeLa 細胞を用いて解析した。これらの細胞にトランスフェリンを取り込ませたところ、SH3BP5/SH3BP5L との部分的な共局在性が認められた。また、SH3BP5/SH3BP5L はリサイクリングエンドソームマーカーである Rab11 と共局在を示したことから、これらは主にリサイクリングエンドソームに局在することが明らかとなった。また、東大深井グループとの共同研究により REI/SH3BP5 ファミリータンパク質の精製及び結晶構造解析を試みた結果、SH3BP5 GEF ドメイン単独およびその Rab11a との複合体の結晶構造を解明することに成功した。その結果、SH3BP5 は 2 つのコイルドコイルを含む V 字型構造をとっており、1 および 4 からなるコイルドコイル領域が Rab11a 結合および GEF 活性に単独で関与していることが判明した。この際、SH3BP5 は、Rab11a の N 末端領域、スイッチ I、スイッチ間およびスイッチ II と相互作用して Rab11a のスイッチ I 領域を引き出して変形させることにより、Rab11a からの GDP 放出を促進することが判明し、これまで知られていた他の GEF とは全く異なる様式で GEF 活性を示すことが明らかとなった。一方、SH3BP5 および SH3BP5L は Rab11 に加え Rab14 と一部リサイクリングエンドソーム上で共局在を示すが、Rab14 に対する GEF 活性はないことから、Rab11 ファミリー特異的に作用する GEF であることが明らかとなった。続いて、哺乳類細胞における SH3BP5, SH3BP5L の生理機能についても解析を行った。Rab11 ファミリーのうち Rab11C は様々なガン細胞において高発現しており、5 1 インテグリンを細胞膜へとリサイクリングさせることによって、細胞の移動および浸潤を促進し、ガン細胞の転移に関与することが示唆されている。そこでまず、肺上皮腺ガン細胞において SH3BP5, SH3BP5L をそれぞれ、または両者を発現抑制したところ、細胞の移動能が顕著に阻害された。また、HEK293T 細胞において SH3BP5 と SH3BP5L の欠損細胞と二重欠損細胞を作製し、細胞移動能を解析したところ、SH3BP5, SH3BP5L の一方でも欠損すると細胞移動が抑制され、二重欠損細胞ではより強く抑制されることが判明した。これらのことから SH3BP5 と SH3BP5L は細胞移動を正に制御していることが示唆された。そこで、Rab11 により細胞表面へとリサイクリングされ細胞移動に関わるインテグリンに着目してさらなる解析を行った。まず、ビオチン化法により細胞表面に存在するインテグリンの存在量を確認した。その結果、SH3BP5 等を欠損することによって細胞表面のインテグリン 5 量が増加することが明らかとなった。また、細胞辺縁部の細胞外マトリックスへの接着部分におけるインテグリン 5 は、これらを欠損することによってその凝集性に違いが認められた。以上の結果から、SH3BP5 と SH3BP5L は Rab11 の活性化を介して細胞膜上のインテグリン量を調節することにより、細胞移動を正に制御していることが明らかとなった。現在、SH3BP5 についてはコンディショナル欠損マウス、SH3BP5L については単純欠損マウスを作製し、表現型について解析を進めている。また、両遺伝子の二重欠損マウスの作製

やコンディショナル二重欠損マウスの作製を進行させている。

一方、線虫の RAB-11 GEF である REI-1 の上流因子を探索するため、酵母ツーハイブリッド法による結合因子の同定を試みた。その結果、線虫の REI-1 と相互作用する因子としてゴルジ体に局在する別の低分子量 GTPase ARF-1 を同定した。REI-1 は ARF-1 の GTP 型変異と特に強く相互作用を示し、この遺伝子の欠損線虫の卵内では REI-1 の局在異常がみられることから、ARF-1 は REI-1 の局在性を制御する上流因子として機能する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Goto-Ito Sakurako, Morooka Nobukatsu, Yamagata Atsushi, Sato Yusuke, Sato Ken, Fukai Shuya	4. 巻 2
2. 論文標題 Structural basis of guanine nucleotide exchange for Rab11 by SH3BP5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.201900297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hara Taichi, Maejima Ikuko, Akuzawa Tomoko, Hirai Rika, Kobayashi Hisae, Tsukamoto Satoshi, Tsunoda Mika, Ono Aguri, Yamakoshi Shota, Oikawa Satoshi, Sato Ken	4. 巻 14
2. 論文標題 Rer1-mediated quality control system is required for neural stem cell maintenance during cerebral cortex development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1007647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Higuchi et al.	4. 巻 141
2. 論文標題 Mutations in COA7 cause spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awy104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato Ken, Sato Miyuki	4. 巻 162
2. 論文標題 Multiple ways to prevent transmission of paternal mitochondrial DNA for maternal inheritance in animals	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 247-253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvx052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Ryutarō, Ibayashi Megumi, Tatsumi Takayuki, Yamamoto Atsushi, Kokubo Toshiaki, Miyasaka Naoyuki, Sato Ken, Ikeda Shuntaro, Minami Naojiro, Tsukamoto Satoshi	4. 巻 146
2. 論文標題 Synthesis and maintenance of lipid droplets are essential for mouse preimplantation embryonic development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev181925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.181925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 前島郁子, 古泉博之, 阿久澤共子, 平井里香, 小林久江, 磯部いの八, 榎本和生, 原太一, 佐藤健
2. 発表標題 哺乳動物個体における低分子量GTPase Rab35の機能解析 Physiological analysis of mammalian small GTPase Rab35
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 諸岡信克, 佐藤美由紀, 佐藤健
2. 発表標題 低分子量GTPase Rab11に対する新規GEF SH3BP5/SH3BP5Lの哺乳類における生理機能解析
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 諸岡信克, 佐藤美由紀, 佐藤健
2. 発表標題 低分子量GTPase Rab11に対する新規GDP/GTP交換因子 (GEF) であるSH3BP5およびSH3BP5Lの哺乳類細胞における生理機能の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三枝慶子, 佐藤美由紀, 諸岡信克, 原太一, 佐藤健
2. 発表標題 リポタンパク質の分泌を制御する SFT-4/Surf4 ファミリータンパク質の発見とその機能解析
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤健
2. 発表標題 初期発生における細胞内オルガネラリモデリング機構
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前島郁子, 古泉博之, 阿久澤共子, 平井里香, 小林久江, 磯部いの八, 榎本和生, 原太一, 佐藤健
2. 発表標題 低分子量GTPase Rab35の生理機能解析
3. 学会等名 低分子量GTPase Rab35の生理機能解析
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 諸岡信克, 佐藤美由紀, 佐藤健
2. 発表標題 低分子量GTPase Rab11特異的な新規GEFであるSH3BP5/SH3BP5Lの哺乳類細胞における生理機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----