

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19209008

研究課題名（和文） 細胞小胞輸送に関わる低分子量 GTP 結合蛋白の蛍光イメージングによる時空間的解析

研究課題名（英文） Spatio-temporal analysis of small GTPases involved in vesicular trafficking by fluorescence imaging

研究代表者

松田 道行 (MATSUDA MICHİYUKI)

京都大学・生命科学研究所・教授

研究者番号：10199812

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：FRET、Rab5、Rac、アポトーシス、小胞輸送

1. 研究計画の概要

本研究においては、申請者らの培ってきた FRET プロブ作成技術を他の小胞輸送に関わる低分子量 GTP 結合蛋白群に広げるとともに、今回開発した全反射蛍光顕微鏡を用いた FRET イメージング技術を駆使して、細胞小胞輸送に関わる低分子量 GTP 結合蛋白の小胞輸送過程における ON・OFF の様子を画像化する。そして、これらの知見をもとに、低分子量 GTP 結合蛋白の小胞輸送における役割を明らかにしていく。

2. 研究の進捗状況

Rab ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の活性変化のイメージング： 初期エンドソームに主として存在し、初期エンドソームと小胞の融合を制御している Rab5 を Rab ファミリーの代表として研究した。Rab5 の FRET プロブを作成し、これを用いて Rab5 がアポトーシス細胞を貪食したファゴソームの成熟過程においてどういうタイミングで活性化されるかを可視化した。さらに、この Rab5 の活性変化が、Rac1 活性の急激な低下のあとに起こること、この過程にグアニンヌクレオチド交換因子 Gapex5 が重要な働きをすることを見出した。

Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白の小胞上における活性化のイメージング： われわれが小胞上に存在することを見出した R-Ras を Ras ファミリーの代表として研究した。FRET プロブを作成し、R-Ras が小胞内で高い活性を有すること、これが、別の Ras ファミリー低分子量 GTP 結合蛋白 RalA の活性制御に関与していることを明らかにした。

3. 現在までの達成度

ほぼ全ての実験計画において、期待した結果あるいはそれ以上の結果を得ている。ただし、初期の実験計画のうち、Arf タンパク質に関するもののみが期待する結果を得られていない。

4. 今後の研究の推進方策

Rab ファミリータンパク質の一つ Rab7 についてはそのバイオセンサーの開発も概ね終了し、それを用いた所見については今年中には論文としたい。Arf タンパク質のバイオセンサーについては引き続き開発を継続する。

5. 代表的な研究成果

（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. Takaya, A., Kamio, A., Masuda, M., Mochizuki, N., Sawa, H., Sato, M., Nagashima, K., Mizutani, A., Matsuno, A., Kiyokawa, E., and Matsuda, M. (2007). R-Ras regulates exocytosis by Rgl2/Rlf-mediated activation of RalA on endosomes. *Mol. Biol. Cell* 18, 1850-1860.
2. Hara, S., Kiyokawa, E., Iemura, S. I., Natsume, T., Wassmer, T., Cullen, P. J., Hiai, H., and Matsuda, M. (2008). The DHR1 domain of DOCK180 binds to SNX5 and regulates cation-independent

mannose 6-phosphate receptor transport. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3823-3835.

3. Kitano,M., Nakaya,M., Nakamura,T., Nagata,S., and Matsuda,M. (2008). Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* *453*, 241-245.
4. Nakaya,M., Kitano,M., Matsuda,M., and Nagata,S. (2008). Spatiotemporal regulation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9198-9203.
5. Lu,A., Tebar,F., Alvarez-Moya,B., Lopez-Alcala,C., Calvo,M., Enrich,C., Agell,N., Nakamura,T., Matsuda,M., and Bachs,O. (2009). A clathrin-dependent pathway leads to KRas signaling on late endosomes en route to lysosomes. *J. Cell Biol.* *184*, 863-879.
6. Tachibana,M., Kiyokawa,E., Hara,S., Iemura,S.I., Natsume,T., Manabe,T., and Matsuda,M. (2009). Ankyrin repeat domain 28 (ANKRD28), a novel binding partner of DOCK180, promotes cell migration by regulating focal adhesion formation. *Exp. Cell Res.* *315*, 863-876.

[学会発表] (計 3 件)

- 1、後藤明弘、中村岳史、松田道行：dbcAMP及びNGFによって誘導される神経突起生成のPC12D細胞におけるシグナル伝達と形態変化の違い 第32回日本神経科学大会 名古屋 2009年9月16日～9月18日
- 2、後藤明弘、中村岳史、松田道行：cAMP刺激によるPC12D細胞の神経突起伸展過程におけるシグナル分子のFRETを用いた解析 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 神戸 2008年12月9日－12月12日
- 3、青木一洋、中村岳史、松田道行：NGF-PI3K-Rac1情報伝達経路のin vivoとin silico解析：SHIP2とPTENは神経突起形成を負に制御する。第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同

大会 横浜 2007年12月11日－12月15日

[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] 特記すべきことなし。