

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657032

研究課題名（和文） ダイナミックなリソソーム動態を制御する因子群の探索と機能解析

研究課題名（英文） Screening and analysis of genes involved in regulation of lysosomal dynamics

研究代表者

紺谷 圏二 (KONTANI KENJI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：30302615

研究成果の概要（和文）：リソソームは細胞内において様々な物質分解を担う膜オルガネラである。リソソームと他の膜オルガネラとの直接的な融合が正常な物質分解に必須であるが、その融合の分子機構に関しては不明な点が多い。本研究では線虫 *C. elegans* をモデル生物に用いて、リソソームの細胞内動態を制御する因子群の探索を行い、低分子量Gタンパク質 Arl8 と HOPS 複合体が協調的に機能し、リソソームの融合を制御する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：Lysosomes are membrane organelles responsible for degradation of various macromolecules. Fusion of lysosomes with other membrane organelles is critical for the lysosomal degradation; however, the molecular mechanism underlying the lysosomal fusion is poorly understood. In the present study, I performed genetic screening for genes involved in regulation of lysosomal dynamics using the nematode *C. elegans* as a model organism and found that the small GTPase Arl8 may cooperatively function with the HOPS complex to regulate lysosomal fusion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	330,000	3,330,000

研究分野：細胞生物学、生化学

科研費の分科・細目：生物科学、機能生物化学

キーワード：リソソーム、膜オルガネラ、膜輸送、線虫、Gタンパク質、RNAi

1. 研究開始当初の背景

一般的に細胞内のオルガネラ間輸送は、膜オルガネラから出芽した輸送小胞が、標的の膜オルガネラに運ばれて融合するという“小胞輸送”を介して行われる。しかし、リソソームへの輸送に関しては、膜オルガネラ同士が直接融合・再形成することにより達成されるという点で非常にユニークである (Luzio,

et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007)。具体的には、後期エンドソーム、ファゴソーム、オートファゴソームはリソソームと直接融合し、外来物質や自身の構成成分の分解が達成される。その後リソソームは、それらのハイブリッドオルガネラから再形成され、細胞内のリソソームの数と大きさは概ね一定に保たれている。そのバランスの維持は正常な

リソソーム機能に必須であるが、リソソームのダイナミックな細胞内動態がどのように制御されているかの分子機構に関しては殆ど理解が進んでいない。

研究開始当初、申請者はモデル生物線虫を用いて、新しいタイプの低分子量G蛋白質Arl8の欠損変異体 (*arl-8* 変異体) が、これまで報告されたことのない特徴的なリソソーム・後期エンドソームの形成異常の表現型を示すことを見出していた。この知見を踏まえ、線虫を用いた遺伝学的・形態学的解析手法がリソソームの機能動態を解明する上で有用なツールになると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、リソソーム動態を制御する因子群を、線虫を用いた遺伝学的スクリーニングにより網羅的に探索し、ライブセルイメージングなどの他の評価系も併用することにより、リソソームの機能動態を制御する分子基盤の解明を目指した。本研究ではリソソーム動態に着目したが、他のオルガネラの機能動態解析にも応用可能な実験系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 微分干渉顕微鏡による観察
線虫を 4%アガロースゲル上の 2 mM levamisole を含む M9 中に置いて観察した。微分干渉像は Zeiss Axioimager M1 microscope (Carl Zeiss) を用いて、蛍光像は Zeiss Axioimager M1 microscope (Carl Zeiss) または Nikon ECLPSE TE2000-E 顕微鏡を用いて撮影した。

(2) 各種マーカータンパク質を発現するトランスジェニック線虫の作成
生きた個体内におけるリソソーム、エンドソーム、ファゴソームの動態をモニターする目的で、それらに局在するタンパク質と蛍光タンパク質の融合分子を発現するトランスジェニック線虫を作成した。方法はマイクロインジェクション法により行った (Mello and Fire, 1995)。染色体外アレイの染色体への挿入は紫外線照射により行った (Mitani, 1995)。

(3) Feeding RNAi によるスクリーニング
Feeding RNAi ライブラリーに関しては Geneservice 社及び Open Biosystems 社から購入したものをを用いた。個々の遺伝子に対する double-strand RNA (dsRNA) を発現する大腸菌は 96 well または 384 well フォーマットで供給されたので、まず各クローンを液体培養後、Feeding RNAi 用のプレートに培養す

る。それらを餌としてトランスジェニック動物を生育させることにより、その個体に RNAi を作用させて各オルガネラの形態を観察した。

(4) 単離 coelomocyte を用いたライブセルイメージング

線虫体腔部の組成に近い緩衝液を用いて、単離 coelomocyte の初代培養を行った。線虫を培地中で 30G 針をもちいて裁断し、培地中に遊離してきた coelomocyte をガラスボトムディッシュに単離した。培地には蛍光標識した BSA を添加し、エンドサイトーシスにより coelomocyte に取り込まれた BSA がリソソームへと輸送される様子を、各種オルガネラマーカーと同時にイメージングした。観察装置としては、高速共振ガルバノ搭載の共焦点顕微鏡装置を用い、光毒性、蛍光退色を極力抑えた。各種オルガネラマーカーを発現する野生型及び変異体線虫を用いて、エンドサイトーシスの素過程の比較検討を行った。

(5) ファゴサイトーシスのタイムラプスイメージング

線虫生殖腺におけるファゴサイトーシスのタイムラプスイメージングには Nikon ECLPSE TE2000-E 共焦点顕微鏡を用いた。4%アガロースゲル上の 2 mM levamisole を含む M9 緩衝液中に L4 から 24 時間後の成虫を置き、2-3 分毎に Z 軸方向 3-10 セクションで切った

(2-3 μ m/セクション) 画像を 120-180 分間にわたって撮影した。

4. 研究成果

(1) 低分子量 G タンパク質 Ar18 は、線虫 coelomocyte において、後期エンドソームとリソソームの融合に重要である。

これまでの当研究室の線虫を用いた解析から、線虫 *arl-8* 欠損変異体におけるマクロファージ様細胞 coelomocyte では、小型化した LMP-1 (後期エンドソーム・リソソームのマーカー) 陽性小胞が多数存在することが示されており、*arl-8* が何らかのリソソームに関与する可能性が示唆されていた。そこでエンドサイトーシスされた物質がリソソームへと輸送される過程における *arl-8* の役割を解析する目的で、線虫の体腔部から単離した coelomocyte をガラスボトムディッシュ上で培養し、タイムラプスイメージングを行うための実験系を確立した。まず野生型 coelomocyte を用いた解析から、エンドサイトーシスされた Alexa488-BSA を含む後期エンドソームが、リソソーム酵素 ASP-1 を含むリソソームと融合する様子を観察することに成功した。一方、*arl-8* 変異体 coelomocyte においては、Alexa488-BSA を含む小胞は ASP-1 陽性小胞と非常に近接するものの、両

者が融合する様子は観察されなかった。以上により、*arl-8* は後期エンドソームとリソソームの融合に促進的に機能する因子であることが示唆された。

(2) Arl18 は HOPS 複合体と協調して、リソソームの融合を制御する可能性がある。

arl-8 変異体の表現型解析から、この変異体の生殖腺において多数のアポトーシス細胞が蓄積することを見いだした。線虫生殖腺では、多くの生殖細胞がアポトーシスを起こし、周囲を取り囲む sheath cell という上皮細胞によって貪食・分解除去されることが知られている。そこで、アポトーシス細胞の出現から消失までの時間を計測したところ、アポトーシス細胞の出現頻度は野生型と *arl-8* 変異体間で差は見られなかったが、その消失に要する時間に関しては、野生型で 1 時間以内であったのに対し、*arl-8* 変異体では 100 分以上という大幅な遅延が生じていた。よって *arl-8* 変異体においては、アポトーシス細胞の除去過程に異常が生じ、アポトーシス細胞が蓄積すると考えられた。

そこで、*arl-8* 変異体において、生殖腺のアポトーシス細胞の貪食及び分解を担う sheath cell に ARL-8-GFP を特異的に発現させたところ、アポトーシス細胞が蓄積する表現型は救助され、sheath cell における ARL-8 の機能不全がアポトーシス細胞蓄積の原因であると考えられた。次に、*arl-8* 変異体におけるアポトーシス細胞が sheath cell に貪食されるかを検討する目的で、貪食された死細胞のみを染色することが知られている Acridine Orange による染色を行った。その結果、*arl-8* 変異体におけるアポトーシス細胞は野生型と同様 Acridine Orange で染色されたことから、貪食は正常に行われていることが示唆された。したがって *arl-8* 変異体では貪食後のアポトーシス細胞の分解過程に異常があると考えられた。

sheath cell に貪食されたアポトーシス細胞を含むファゴソームの成熟状態を調べる目的で、初期及び後期ファゴソームマーカー (初期: RAB-5、後期: RAB-7) の局在を検討した。その結果、*arl-8* 変異体において蓄積しているアポトーシス細胞の大部分は RAB-7 陽性であり、RAB-5 陽性数は野生型と同程度であった。よって *arl-8* 変異体におけるファゴソームの成熟化は、RAB-7 陽性の後期段階まで進行していることが示唆された。

RAB-7 陽性のファゴソームは最終的にリソソームと融合してファゴリソソームとなり、内容物の分解が進行する。そこで *arl-8* 変異体においてファゴリソソームが形成されるかを検討した。その結果、コントロールにおいてはリソソーム酵素 NUC-1 を含むリソソームがファゴソームと融合し、NUC-1 がファゴ

ソーム内に広がっていく様子が観察されたが、*arl-8* 変異体ではリソソームがファゴソームの周りに留まりファゴソームと融合する様子は殆ど観察されなかった。

以上の結果から、ARL-8 がファゴソームとリソソームの融合過程に関与し、アポトーシス細胞の効率的な分解に重要な低分子量 G タンパク質であると考えられた。

arl-8 と協調的に機能して働く因子群を明らかにする目的で、*arl-8* 変異体と同様の表現型を示す線虫変異体のスクリーニングを行った。リソソーム膜に局在すると考えられる約 200 種類の因子に対する Feeding RNAi を行い、その表現型を観察した結果、酵母液胞の融合に関与することが知られている HOPS 複合体のコンポーネントである *vps-39* 及び *vps-41* に対する RNAi が、*arl-8* 変異体と同様の表現型を示すことを見出した。よって、ARL-8 は HOPS 複合体と協調してファゴソームとリソソームの融合を正に制御し、アポトーシス細胞の速やかな分解除去に寄与する可能性が示唆された。

上記の結果から、低分子量 G タンパク質 *arl-8* がリソソームと様々な膜オルガネラとの膜融合を制御する、新たな制御因子であることが示唆された。

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 7 件)

①Takahashi, S., Ebihara, A., Kajiho, H., Kontani, K., Nishina, H., and Katada, T. (2011). RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ* 18, 645-655. 査読有
DOI: 10.1038/cdd.2010.137

②Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K., Malhotra, V., and Katada, T. (2011). cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* 22, 2301-2308.
DOI: 10.1091/mbc.E11-02-0143 査読有

③Kajiho, H., Sakurai, K., Minoda, T., Yoshikawa, M., Nakagawa, S., Fukushima, S., Kontani, K., and Katada, T. (2011). Characterization of RIN3 as a guanine nucleotide exchange factor for the Rab5 subfamily GTPase Rab31. *J Biol Chem* 286, 24364-24373. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M110.172445

④Takahashi, S., Sakurai, K., Ebihara, A., Kajiho, H., Saito, K., Kontani, K., Nishina, H., and Katada, T. (2011). RhoA

activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res* 39, 3446-3457. 査読有

DOI: 10.1093/nar/gkq1302

⑤ Nakae, I., Fujino, T., Kobayashi, T., Sasaki, A., Kikko, Y., Fukuyama, M., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Kontani, K., and Katada, T. (2010). The Arf-like GTPase Arl8 Mediates Delivery of Endocytosed Macromolecules to Lysosomes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. 21, 2434-2442. 査読有

DOI: 10.1091/mbc.E09-12-1010

⑥ Klassen, M. P., Wu, Y. E., Maeder, C. I., Nakae, I., Cueva, J. G., Lehrman, E. K., Tada, M., Gengyo-Ando, K., Wang, G. J., Goodman, M., Mitani, S., Kontani, K., Katada, T., and Shen, K. (2010). An Arf-like small G protein, ARL-8, promotes the axonal transport of presynaptic cargoes by suppressing vesicle aggregation. *Neuron* 66, 710-723. 査読有

DOI: 10.1016/j.neuron.2010.04.033

⑦ Cevik, S., Hori, Y., Kaplan, O. I., Kida, K., Toivenon, T., Foley-Fisher, C., Cottell, D., Katada, T., Kontani, K., and Blacque, O. E. (2010). Joubert syndrome Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes protein transport in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 188, 953-969. 査読有

DOI: 10.1083/jcb.200908133

[学会発表] (計 11 件)

① 阿部 芙美子、他. マルチドメイン型 Rab ファミリー G 蛋白質 EFCAB4Ba の機能解析 [ファーマ・バイオフィオーラム 2011; 2011 年 10 月 8 日/仙台]

② 紺谷 圏二、他. リソソームへの輸送における低分子量 G タンパク質 Arl8 の機能解析 [第 84 回日本生化学会大会; 2011 年 9 月 24 日/京都]

③ 堀 裕次、他. The ciliary small GTPase Arl13b (I): Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes intraflagellar transport. [第 63 回日本細胞生物学会大会; 2011 年 6 月 27 日/札幌]

④ 永島 慎一、他. The ciliary small GTPase Arl13b (II): Arl13b functions at ciliary membranes and stabilizes intraflagellar transport. [第 63 回日本細胞生物学会大会; 2011 年 6 月 27 日/札幌]

⑤ 紺谷 圏二、他. Arf-like GTPase が介在する細胞内ロジスティクスと関連疾患 [文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研

究 第 3 回「細胞内ロジスティクス」班会議; 2011 年 6 月 3 日/鳥羽]

⑥ 堀 裕次、他. Functional analysis of the ciliary small GTPase Arl13b [The 3rd Global COE Retreat; 2010 年 12 月 11 日/幕張]

⑦ 壹岐 和哉、他. 線虫 *C. elegans* を用いた低分子量 G タンパク質 Rag の機能解析 [第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会; 2010 年 12 月 10 日/神戸]

⑧ 伊藤 有佳子、他. 線虫 *C. elegans* を用いたアミノ酸シグナル伝達に介在する低分子量 G 蛋白質 Rag の機能解析 [ファーマ・バイオフィオーラム 2010; 2010 年 10 月 2 日/京都]

⑨ 永島 慎一、他. 低分子量 G タンパク質 Arl13b の繊毛局在化メカニズムの解析 [ファーマ・バイオフィオーラム 2010; 2010 年 10 月 2 日/京都]

⑩ 紺谷 圏二、他. リソソームの機能制御に介在する低分子量 G 蛋白質 Arl8 の解析 [第 9 回生命科学研究会; 2010 年 6 月 25 日/筑波]

⑪ 福山 征光、他. Foxo and RagA link multiple stem cell lineages to coordinate somatic development in *C. elegans* [第 43 回日本発生生物学会; 2010 年 6 月 21 日/京都]

[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]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紺谷 圏二 (KONTANI KENJI)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号: 30302615