

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570162

研究課題名(和文)細胞内膜輸送における低分子量GTPase ARFとRabのクロストーク

研究課題名(英文)Functional crosstalk between ARF and Rab small GTPases

研究代表者

申 惠媛 (SHIN, Hye-Won)

京都大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10345598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：私はARF1/3もしくはARF1/4を同時にノックダウンすると、Rab4やRab11の局在するリサイクリングエンドソームがtubule化することを見出した。さらにARF1/3はリサイクリングエンドソームから細胞膜へのリサイクル経路を、ARF1/4はリサイクリングエンドソームからゴルジ体への輸送を調節することを明らかにした。異なるARFペアがredundantに働き、リサイクリングエンドソームから異なる輸送経路を調節していることがわかった。ARF1/3、ARF1/4のペアは異なるエフェクターをリクルートすることにより、特異的な膜マイクロドメインを形成して異なる輸送を調節すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Small GTPases of the ARF family, except for ARF6, mainly localize to the Golgi apparatus, where they trigger formation of coated carrier vesicles. I found that the simultaneous depletion of ARF1/ARF3 or ARF1/ARF4 induced extensive tubulation of Rab4- and Rab11-positive recycling endosomes. Moreover, ARF1/ARF3 are redundantly required for recycling pathway from the recycling endosomes to the plasma membrane. On the other hand, ARF1/ARF4 are redundantly required for the retrograde transport of TGN38 and mannose-6-phosphate receptor from recycling endosomes to the trans-Golgi network (TGN), but was not required for the recycling pathway. It remains important to determine how distinct combinations of ARFs sort cargos targeted to distinct organelles and regulate separate transport processes on the same compartments. ARFs may act within distinct membrane microdomains along with distinct effector proteins.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物科学

キーワード：メンブレントラフィック 小胞輸送 エンドソーム 生体膜 Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

細胞の恒常性は、細胞の中で合成されたタンパク質がトランスゴルジネットワークおよびエンドソームで正しく選別され、機能すべき場所へと正しく運ばれることで維持されている。私は、複雑な輸送経路のうち、複雑で未解明な部分の多いゴルジ体以降の輸送経路（ゴルジ体、エンドソーム、細胞膜を結ぶ輸送経路）の制御機構を明らかにすることを目指している。

細胞内小器官の間のタンパク質輸送は輸送小胞を介して行われ、小胞の形成・運搬・融合の各過程は特定の分子群により制御されている。低分子量 GTPase の ARF は輸送小胞の形成に、Rab は主に輸送小胞のターゲティングや融合を調節する分子であると考えられてきた。ARF と Rab はヒトでそれぞれ 5 種類と 60 種類以上存在し、特異的なオルガネラに局在する。活性化された GTP 結合型の ARF や Rab はさまざまなエフェクター分子をオルガネラ膜にリクルートし、小胞輸送における分子スイッチとして重要な役割を担っている。研究開始当初は ARF と Rab のクロストークに分子機構の解明を目指したが、研究の途中 ARF がエンドソームで機能する可能性を始めて見出した。これまでに 5 種類の ARF のうち、ARF6 を除いた ARF1, 3, 4, 5 はゴルジ体に局在すると考えられていた。さらに、各 ARF の特異的機能および ARF の間の機能のクロストークはまったく不明であったので ARF 間のクロストークによる輸送経路の解明に研究を進めた。

2. 研究の目的

細胞内メンブレントラフィックにおいて ARF ファミリータンパク質はどこでどのように輸送小胞の形成に関与するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ARF を単独あるいは組み合わせでノック

ダウンし、オルガネラ（ゴルジ体やエンドソーム）の形態の観察

(2) EGFP 標識したエンドソームのマーカータンパク質を安定発現する細胞を用いて ARF のノックダウンによるエンドソームの動態をライブイメージングにより観察

(3) ARF のノックダウンした細胞を用いてエンドソームを介する輸送経路を検証（図 2、～）

(4) ARF のノックダウンした細胞を用いてコートタンパク質を含む小胞形成や選別に必要なタンパク質の局在変化を検証

4. 研究成果

(1) ゴルジ体に局在する ARF を単独でノックダウンしてもゴルジ体やエンドソームの形態変化は見られなかった。一方、ARF1 と ARF3、ARF1 と ARF4 を同時にノックダウンした細胞においてエンドソームが著しく tubule 化していた（図 1、B-B'、D-D'）。特に、Rab4 や Rab11 の局在するリサイクリングエンドソームが tubule 化することがわかった。つまり主にゴルジ体に局在し、機能すると考えられていた ARF1, 3, 4 がエンドソームで機能する可能性が初めて示唆された。

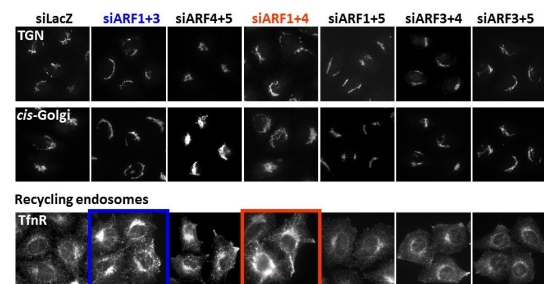


図 1.

(2) ARF1/3, ARF1/4 をノックダウンした細胞を用いて EGFP-TfnR の tubule 化の動態をタイムラプスイメージングにより観察を行った。ARF1/3 のノックダウンした細胞においてはエンドソームからダイナミックな tubule の形成が見られ、これらは微小管依存的に形成されることがわかった。一方、ARF1/4 をノックダウンした細胞においては EGFP-TfnR の tubule はもっと安定に形成され

ていてこれらも微小管依存的であるものの ARF1/3 ノックダウンによる tubule よりは安定していることがわかった。したがって、tubule の安定性は異なるが、ARF1/3, ARF1/4 はリサイクリングエンドソームの形態維持に関与すると考えられた。

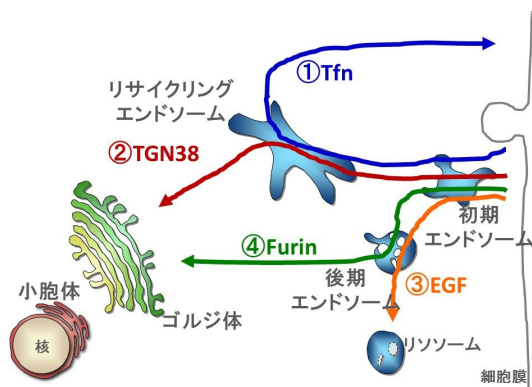


図 2 .

(3) ARF1/3, ARF1/4 をノックダウンした細胞を用いてリサイクリングエンドソームを介する輸送経路における影響を調べた。調べた積荷は図 2 のように、エンドサイトーシスされた後、リサイクリングエンドソームを経由して細胞膜にリサイクルされるトランスフェリン (Tfn)、エンドサイトーシスされた後、リサイクリングエンドソームを経由してゴルジ体に輸送されるマンノース 6 リン酸受容体 (M6PR) と TGN38、エンドサイトーシスされた後、後期エンドソームを経てリソソームで分解される EGF、エンドサイトーシスされた後、後期エンドソームを経てゴルジ体に輸送される Furin である。

ARF1/3 をノックダウンした細胞では、Tfn のリサイクリングエンドソームから細胞膜へのリサイクルが遅延し、エンドソームに蓄

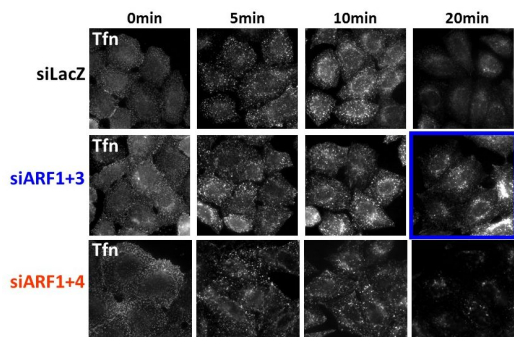


図 3 .

積することが観察された。一方、ARF1/4 をノックダウンした細胞では Tfn のリサイクルには影響がなかった (図 3)。

ARF1/4 をノックダウンした細胞では、M6PR と TGN38 のリサイクリングエンドソームからゴルジ体への輸送が遅延し、特に TGN38 は後期エンドソームにミスソートされることがわかった。一方、ARF1/3 をノックダウンした細胞では影響が認められなかった (図 4)。

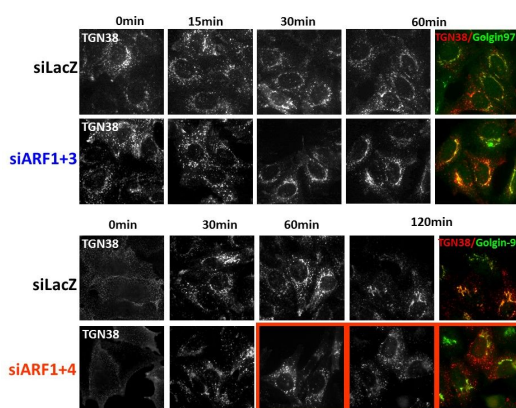


図 4 .

ARF1/3, ARF1/4 のどちらのノックダウンした細胞でも、EGF の後期エンドソームからの輸送および分解には影響を及ぼさなかった。

ARF1/3, ARF1/4 のどちらのノックダウンした細胞でも Furin の後期エンドソームからゴルジ体への輸送には影響を及ぼさなかった (図 5)。

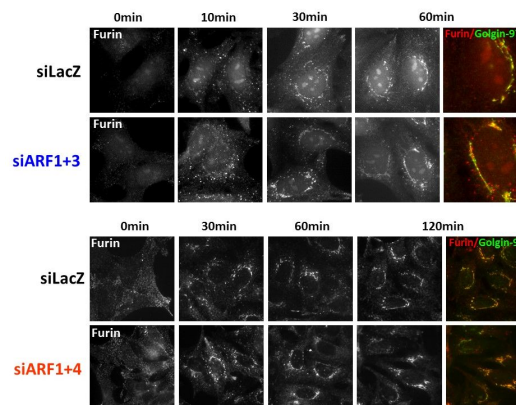


図 5 .

これらの結果をまとめると、ARF1/3, ARF1/4 の各ペアはリサイクリングエンドソームの形態維持に必要である。一方、ARF1/3 は Tfn のリサイクリングエンドソーム

から細胞膜への輸送、ARF1/4 は TGN38 や M6PR のリサイクリングエンドソームからゴルジ体への輸送に関与することが明らかとなった。つまり、異なるペアの ARF はリサイクリングエンドソームにおいて異なる輸送経路を調節していると考えられる。

(4) ARF1/4 のノックダウンした細胞において AP-1/クラスリンアダプタータンパク質がエンドソームから解離することがわかった。したがって、ARF1/3, ARF1/4 のペアは異なるエフェクタータンパク質をリクルートすることにより、特異的な膜マイクロドメインを形成して異なる輸送経路を調節すると考えられる(図6)。

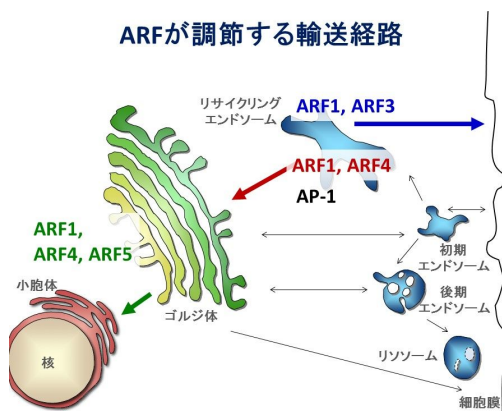


図6.

本研究では初めて ARF1、3、4 がゴルジ体だけではなく、エンドソームで機能することを明らかにした。さらに ARF1 を共通にするものの ARF1/3, ARF1/4 が redundancy をもって機能し、さらにエンドソームから異なる輸送経路を制御することを初めて明らかにした。この輸送経路の選別機構およびエンドソームの形態維持の分子機構を解明するためには ARF1/3, ARF1/4 それぞれに特異的に結合するエフェクタータンパク質を同定することが必要と考えられる。

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12件)

§ Corresponding author,

Nakai, W., Kondo, Y., Saitoh, A., Naito, T., Nakayama, K., and Shin, H.-W. §

(2013) ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2570-2581. 査読有. 10.1091/mbc.E13-04-0197

Ueda, T., Hanai, A., Takei, T., Kubo, K., Ohgi, M., Sakagami, H., Takahashi, S.,

Shin, H.-W., and Nakayama, K. (2013)

EFA6 activates Arf6 and participates in its targeting to the Flemming body during cytokinesis. *FEBS Lett.* **587**, 1617-1623. 査読有

Takatsu, H., Katoh, Y., Ueda, T., Waguri, S., Murayama, T., Takahashi, S., Shin, H.-W., and Nakayama, K. (2013)

Mitosis-coupled, microtubule-dependent clustering of endosomal vesicles around centrosomes. *Cell Struct. Funct.* **38**, 31-41. 査読有.

10.1247/csf.12028

Kondo, Y., Hanai, A., Nakai, W., Katoh, Y., Nakayama, K., and Shin, H.-W. §

(2012) ARF1 and ARF3 are required for the integrity of recycling endosomes and the recycling pathway to the plasma membrane. *Cell Struct. Funct.* **37**, 141-154. 査読有. 10.1247/csf.12015

Shin, H.-W. §, Takatsu, H., and Nakayama, K. (2012) Mechanisms of membrane curvature generation in membrane traffic. *Membranes.* **2**, 118-133. 査読有. 10.3390/membranes2010118

Nakamura, K., Man, Z., Xie, Y., Hanai, A., Makyio, H., Kawasaki, M., Kato, R.,

Shin, H.-W., Nakayama, K., and Wakatsuki, S. (2012) Structural basis for membrane binding specificity of the Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) domain of Arfaptin-2 determined by Arf1 GTPase. *J. Biol. Chem.* **287**, 25478-25489. 査読有. 10.1074/jbc.M112.365783

申惠媛[§]、満智秋、中山和久 (2012) ゴルジ体以降の小胞輸送における低分子量 GTPase と BAR ドメインタンパク質の役割.

生化学, **84**, 785-790. 査読無

Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H.-W., Katoh, Y., and Nakayama, K. (2012) Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **125**, 4049-4057. 査読有. 10.1242/jcs.102913

Makyo, H., Ohgi, M., Takei, T., Takahashi, S., Takatsu, H., Katoh, Y., Hanai, A., Ueda, T., Kanaho, Y., Xie, Y., Shin, H.-W., Kamikubo, H., Kataoka, M., Kawasaki, M., Kato, R., Wakatsuki, S., and Nakayama, K. (2012) Structural basis for Arf6-MKLP1 complex formation on the Flemming body responsible for cytokinesis. *EMBO J.* **31**, 2590-2603. 査読有. 10.1038/emboj.2012.89.

Takashima, K., Saitoh, A., Hirose, S., Nakai, W., Kondo, Y., Takasu, Y., Kakeya, H., Shin, H.-W., and Nakayama, K.

(2011) GBF1-Arf-COPI-ArfGAP-mediated Golgi-to-ER transport involved in regulation of lipid homeostasis. *Cell Struct. Funct.* **36**, 223-235. 査読有. 10.1247/csf.11035

Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K., & Shin, H.-W.[§] (2011) ATP9B, a P4-ATPase (a putative

aminophospholipid translocase), localizes to the *trans*-Golgi network in a CDC50-independent manner. *J. Biol. Chem.* **286**, 38159-38167. 査読有. 10.1074/jbc.M111.281006

Takahashi, S., Takei, T., Koga, H., Takatsu, H., Shin, H.-W., and Nakayama, K. (2011) Distinct roles of Rab11 and Arf6 in the regulation of Rab11/FIP3/arfophilin-1 localization in mitotic cells. *Genes Cells*, **16**, 938-950. 査読有. 10.1111/j.1365-2443.2011.01538.x

[学会発表](計 11 件)

申 惠媛 (2013) リサイクリングエンドソームを介する輸送経路におけるタンパク質とリン脂質の協調的作用. 第 86 回日本生化学会大会. シンポジウム. 招待講演、横浜、9 月 11 日~13 日

申 惠媛 (2013) Membrane remodeling in post-Golgi trafficking. 第 65 回日本細胞生物学会大会. シンポジウム. 招待講演名古屋(ウインクあいち) 6 月 19 日~21 日

申 惠媛 (2012) 生体膜の非対称性を制御する P4-ATPase の小胞輸送における機能. 第 34 回生体膜の薬物の相互作用シンポジウム、京都(京大) 11 月 15 日~16 日

海野 寛之 (2012) 生体膜の脂質非対称性を調節する P4-ATPase のゴルジ体以降の小胞輸送経路における機能解析. 第 85 回日本生化学会大会、福岡、12 月 14 日~16 日

申 惠媛 (2011) ゴルジ体に局在する低分子量 GTPase ARF の機能の再考. 第 84 回日本生化学会大会 シンポジウム. 招待公演、京都、9 月 21 日~24 日

高津 宏之 (2011) メンブレントラフィックにおける P4-ATPase、ATP9B の機能解析 . 第 84 回日本生化学会大会 . 京都、9 月 21 日~24 日

島 孝弘 (2011) 脂質二重層の非対称性を調節する P4-ATPase のメンブレントラフィックにおける役割 . 第 84 回日本生化学会大会 . 京都、9 月 21 日~24 日

高島 昭平 (2011) ゴルジ体 小胞体間のタンパク質輸送による脂肪滴形成の調節 . 第 84 回日本生化学会大会 . 京都、9 月 21 日 24 日

中井 和香 (2011) Functional analysis of class I and classII ARF small GTPases in membrane traffic. 第 63 回日本細胞生物学会大会 . 札幌、6 月

高島 皓平 (2011) Regulation of lipid droplet formation by Golgi-to-ER membrane traffic. 第 63 回日本細胞生物学会大会 . 札幌、6 月

満 智秋 (2011) Arfaptins localize to the trans-Golgi in an Arl1-dependent manner and deform Golgi membranes. 第 63 回日本細胞生物学会大会 . 札幌、6 月

[その他]

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/hshin/ShinIndex.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

申 惠媛 (SHIN, Hye-Won)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号 : 10345598