

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590193

研究課題名（和文） 哺乳類トランスゴルジ網およびエンドソームにおける分子選別の時空間解析

研究課題名（英文） Spacio-temporal analysis of molecular sorting events in mammalian trans-Golgi network and endosomes

研究代表者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30244908

研究成果の概要：本課題では、細胞内のトランスゴルジネットワーク (TGN) からエンドソームへの小胞輸送を制御する単量体クラスリンアダプタータンパク質であるGGAsの機能について、ライブセルイメージング法およびRNAi法等を用いて詳細に解析した。その結果、GGAがカーゴタンパク質であるカチオン非依存性マンノース6リン酸受容体のTGNにおける選別過程のみならず、分子のターンオーバーに関わることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：TGN、エンドソーム、小胞輸送、クラスリン、GGA、マンノース6リン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

トランスゴルジ網 (TGN, trans-Golgi network) やエンドソームは、様々な脂質、タンパク質の選別ステーションとして知られている。中でもクラスリン被覆を介したマンノース6リン酸受容体 (MPR, mannose 6-phosphate receptor) の選別は、新たに合成されたリソソーム酵素の配送局在化機構として重要である。同受容体輸送に関わるクラスリンアダプター分子としては、現在、AP1 (adaptor protein complex 1) および GGA1, 2, 3 (Golgi-localized, γ -ear containing,

ADP-ribosylation factor binding protein 1, 2, 3) が知られているが、これらは TGN のみならず、エンドソームにおいても重要な機能を果たすことが報告されている。近年、これらアダプター分子に関わるクラスリン被覆の形成、制御機構に関して、新たな分子が次々と見つかり、より複雑な分子間相互作用ネットワークが形成されつつある。しかし重要な事に、相互作用の場であるオルガネラや、オルガネラ膜上での局在が推測の域を出ないのが現状であり、実際に起きている現象の理解にはほど遠い。より具体的な例としては、1) AP1 の作用部位が TGN か、

エンドソームか、あるいは TGN 由来の輸送キャリアーかという問題、そして 2) AP1 と GGA は、同一のクラスリン被覆小胞にあるのか、別々の小胞にあるのか、あるいは GGA 陽性小胞から AP1 陽性小胞へのカーゴの受け渡しが実在するのか否かという問題は、未だ解決されていない状態であった。

2. 研究の目的

(1) ライブセルイメージング用モデル細胞の確立とその解析: TGN 由来の MPR 陽性輸送キャリアー、エンドソーム、GGA、および AP1 の細胞内動態を光学顕微鏡下に捉え、これら分子の相互関係、機能分担を明らかにする。

(2) RNAi 実験によるクラスリンアダプター分子の機能解析: GGA および AP1 の発現低下実験を行い、ライブセルイメージングや形態学的解析法を用いて、TGN およびエンドソームにおける両者の機能分担を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ライブセルイメージング用モデル細胞の確立とその解析

① 哺乳類培養細胞にタンパク質を発現させるため、mGFP, mCherry を融合させた MPR, AP1, GGA1, GGA2 および GGA3 の cDNA の発現ベクターを作製する。

② 上記 cDNA を一過性、あるいは安定に発現させ、生化学および形態学的実験によりその有効性を評価する。

③ これら細胞を用いてライブセルイメージング解析を行う。

(2) RNAi 実験によるクラスリンアダプター分子の機能解析

① GGA および AP1 の発現低下実験として有効な RNAi 実験用 oligo-duplex を探索する。すなわち、タンパク質量減少の効率やオフターゲット効果の有無などを評価する。有用なものについては、発現ベクターに組み込み、安定に発現低下した細胞株を作製する。

② 上記にて確立した RNAi 実験において、MPR、クラスリン、GGA, 1, 2, 3、および AP1 の光学顕微鏡レベルでの局在変化を解析する。

③ 上記にて確立した RNAi 実験において、MPR、クラスリン、GGA, 1, 2, 3、および AP1 の電子顕微鏡レベルでの局在変化を解析する。

④ GFP を MPR の細胞質ドメインに付加したキメラタンパク質 (GFP-MPRtail) を安定に発現する HeLa 細胞である 2B5 細胞を有している。同細胞にて上記 RNAi 実験を行い、GFP-MPRtail の輸送動態をタイムラプス観察および FRAP (fluorescence recovery after

photobleaching) 実験により解析する。

4. 研究成果

(1) ライブセルイメージング用モデル細胞の確立とその解析

① mCherry-CIMPR の安定発現 HeLa 細胞 “MCM 細胞” の作製に成功した。同細胞において mCherry-CIMPR は核周囲と末梢の点状構造に局在した。核周囲のシグナルは GGA1 と一致することから TGN であることを示唆する (図 1)。

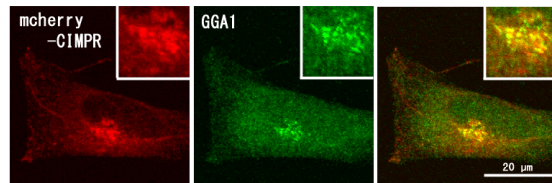


図1. MCM細胞におけるmcherry-CIMPRの局在

同細胞をタイムラプス観察した結果、TGN から放出される輸送キャリアーなどが観察されたため、今後のライブセルイメージング解析に応用する予定である。同細胞は全長の CIMPR を可視化するツールとしては初めてのものであり、この意味で内在性の CIMPR の挙動を最も忠実に反映すると考えられる。

② mCherry-GGA1 の安定発現 HeLa 細胞 “G1A4 細胞” の作製に成功した。同細胞において mCherry-GGA1 は主に核周囲に局在した。同シグナルはクラスリン (CHC) と一部共局在し、GGA3 とほぼ完全に一致することから、TGN に局在し、クラスリンアダプターとして機能することを示唆する (図 2)。

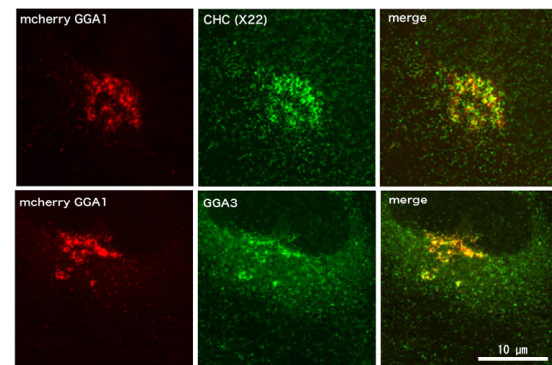


図2. G1A4細胞におけるmcherry-GGA1の局在

同細胞を FRAP 観察した結果、mCherry-GGA1 が TGN 膜への結合解離を速やかに行なっていることが分かった。今後、同細胞に mGFP-AP1 を発現させて GGA と AP1 の相互作用動態を解析する予定である。

(2) RNAi 実験によるクラスリンアダプター分子の機能解析

① GGA2 の発現が低下した HeLa 細胞株“G2D 細胞”の作製に成功した。同細胞において GGA2 は正常の 5% 以下に減少していた (図 3A) が、GGA1 と GGA3 のタンパク量 (図 3A) および局在様式 (結果は示さない) に大きな変化は見られなかった。また、GGA が結合するカーゴタンパク質である CIMPR および CDMPR の光学顕微鏡レベルでの分布に大きな変化は認められなかった (図 3B)。一方、これら 2 種類の MPR が輸送するリソソーム酵素の一つ、カテプシン D の培地中への誤輸送効率について解析したところ、2 種類の G2D 細胞において同酵素の培地中への分泌が有意に増加していた (図 3C)。以上の結果は、GGA2 がカテプシン D の効率的選別輸送に関わるが、MPR の劇的な局在変化を伴わないことを示す。

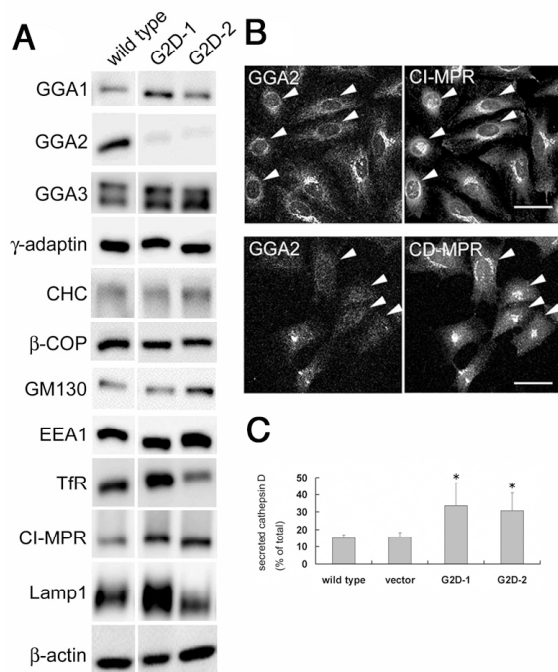


図3. GGA2ノックダウン細胞の解析
野生型Hela 細胞およびHeLa細胞から作られた2種類のGGA2ノックダウン細胞(G2D-1, G2D-2) について、ウエスタンブロット法(A)、免疫蛍光法によるCIMPRおよびCDMPRの局在(B)、および[35S]-メチオニンを用いたパルスチェイス法によるカテプシンDの培地中への分泌(誤輸送)効率(C)について解析した。Bのスケール: 50 μm。BではG2D-1細胞と野生型HeLa細胞を共培養した。

本研究により、初めて GGA2 を特異的に発現低下する HeLa 細胞を作成した。同細胞を用いれば、将来的に GGA2 特異的な機能の解析ができる。

②2B5 細胞における RNAi 実験

同細胞において一過性に GGA1, 2, 3 の発現低下を誘導できる RNAi 用 oligo-duplex を探索し、最も効率の良いものを選択した。その結果、

GGA2 及び 3 のノックダウンにより GFP-MPRtail の細胞全体のシグナルが強くなり (図 4B)、免疫ブロットにおいても GFP-MPRtail の蓄積が確認された (図 4A)。免疫電顕法において GFP-MPRtail は TGN 近傍の小胞構造ではなく、より大きな小胞や小管構造に局在する傾向が見られた (図 5B)。さらに、GGA3 ノックダウンにより細胞質中に GFP 陽性の粗大顆粒が出現し (図 4B inset)、これらは FRAP 実験により細胞質タンパク質との交換速度が低いことが判明し、凝集体様構造物と考えられた。免疫電顕法により、この顆粒が小胞あるいは小管構造から成る集合体であることが示唆された (図 5C)。これらの結果より、GGA3 が MPR の細胞内における選別輸送及びターンオーバー(分解)に関わっており、GGA3 の発現低下により GFP-MPRtail が本来の輸送ルートをはずれ細胞内に蓄積していることが考えられた。

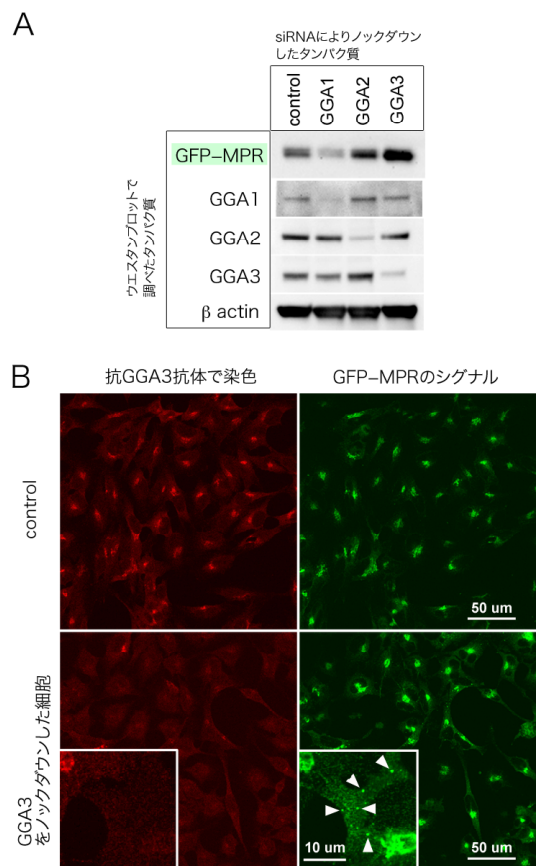
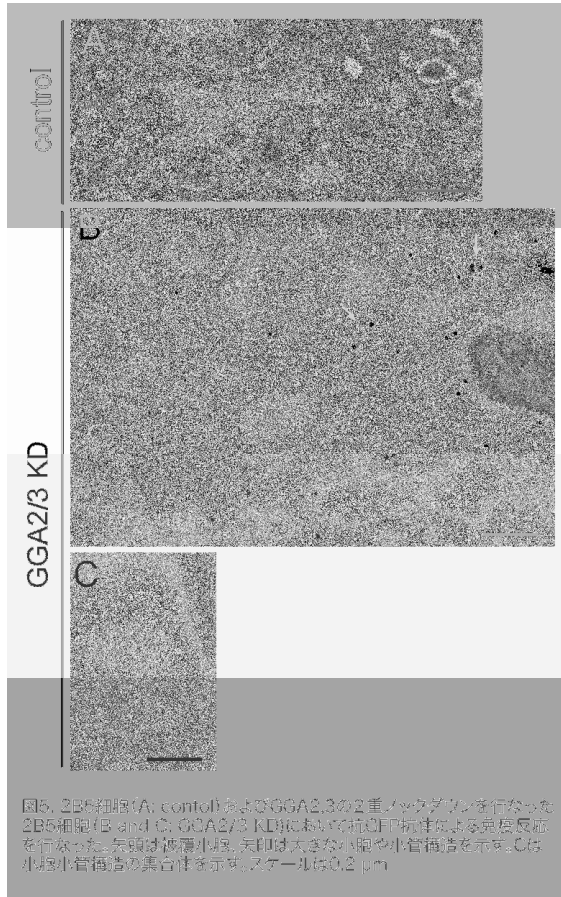


図4. 2B5細胞でGGAのノックダウン実験を行い、ウエスタンブロット (A) と免疫蛍光法 (B) で解析した。矢頭は凝集体様構造物を示す。

本研究では、GGA ノックダウンによる表現型として、MPR の細胞内蓄積、電顕レベルでの局在様式変化、および MPR 陽性の凝集体様構造物の出現を初めて見いだした。これら変化の機構を解明することで GGA の新機能を明らかにできるとともに、凝集体蓄積に関わる疾患への研究発展の糸口を見いだした。本研究を論文とし

て投稿準備中である。



一方、当初の目的であった GGA ノックダウン細胞における GFP-MPRtail の挙動解析については、タイムラプス観察による TGN 由来輸送キャリアーの解析、および FRAP 法による輸送動態解析を行なった。しかし、GGA ノックダウンによる大きな変化は検出できなかった。GGA はライブセルイメージングで観察できるレベルの TGN-エンドソーム輸送には直接関与しないのかもしれない。

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 8 件)

- 1) Waguri S and Komatsu M, Biochemical and morphological detection of inclusion bodies in autophagy-deficient mice. *Methods Enzymol.* (2009) 453:181-196. 査読有り
- 2) Gotoh K, Lu Z, Morita M, Shibata M, Koike M, Waguri S, Dono K, Doki Y, Kominami E, Sugioka A, Monden M, Uchiyama Y: Participation of autophagy in the initiation of graft dysfunction after rat liver transplantation. *Autophagy.* (2009) 5:351-360. 査読有り
- 3) Sou YS*, Waguri S* (equal contribution), Iwata JI, Ueno T, Fujimura T, Hara T, Sawada N,

Yamada A, Mizushima N, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M: The atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell.* (2008) 19:4762-4775 査読有り

- 4) Fujibayashi A, Taguchi T, Misaki R, Ohtani M, Dohmae N, Takio K, Yamada M, Gu J, Yamakami M, Fukuda M, Waguri S, Uchiyama Y, Yoshimori T, Sekiguchi K. Human RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosome. *Cell Struct Funct.* (2008) 33:35-50 査読有り
- 5) Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, Tanaka K, Uchiyama Y. Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury. *Am J Pathol.* (2008) 172:454-469 査読有り
- 6) Hida T, Ikeda H, Kametaka S, Akazawa C, Kohsaka S, Ebisu S, Uchiyama Y, Waguri S. Specific depletion of GGA2 causes cathepsin D missorting in HeLa cells. *Arch Histol Cytol.* (2007) 70:303-312 査読有り
- 7) Sakamoto K, Honda T, Yokoya S, Waguri S, Kimura J. Rab-small GTPases are involved in fluvastatin and pravastatin-induced vacuolation in rat skeletal myofibers. *FASEB J.* (2007) 21:4087-4094 査読有り
- 8) Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* (2007) 131:1149-1163. 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 和栗聡: 高等動物におけるオートファジーの生理機能と隔離膜成熟機構, 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 2009 年 3 月 30 日, 岡山
- 2) マウス組織における β Klotho の発現分布解析: 山本雅哉, 亀高諭, 和栗聡, 第 113 回日本解剖学会, 2009 年 3 月 29 日, 岡山
- 3) 亀高諭, 和栗聡: ショウジョウバエ細胞を用いたクラスリンアダプターの機能解析, 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 2009 年 3 月 28 日, 岡山
- 4) 澤田直樹, 亀高諭, 池田寛子, 笹本まどか, 和栗聡: GFP-MPR 融合タンパク質を安定に発現する HeLa 細胞を用いた GGA3 の機能解析, 第 114 回日本解剖学会全国学術集会, 2009

年 3 月 28 日, 岡山

- 5) 池田寛子, 亀高諭, 和栗聡: Different phenotypes caused by specific depletion of GGA1, 2, or 3 in HeLa cells 第 60 回日本細胞生物学会, 2008 年 6 月 30 日, 横浜
- 6) 池田寛子, 亀高諭, 和栗聡: HeLa 細胞で見られた GGA1,2,3 の特異的発現低下による表現形の違い, 第 114 回日本解剖学会, 2008 年 3 月 27 日, 大分
- 7) 和栗聡, 富山雄人, 池田寛子, 飛田達宏, 酒井規夫, 谷池雅子, 恵比寿繁之, 内山安男: The luminal domain participates in the endosomal trafficking of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor 第 59 回日本細胞生物学会, 2007 年 5 月 30 日, 福岡
- 8) 和栗聡: 光学顕微鏡で捉える TGN-エンドソーム間のリサイクリング輸送, 第 63 回日本顕微鏡学会, 2007 年 5 月 2 日, 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和栗 聡 (WAGURI SATOSHI)

公立大学法人福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30244908

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし