

平成21年 5月30日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号： 19770169

研究課題名 (和文) 低分子量 GTPase ARFRP1 によるメンブレントラフィックの調節

研究課題名 (英文) Regulation of membrane trafficking by small GTPase ARFRP1

研究代表者

申 惠媛 (SHIN Hye-Won)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：10345598

研究成果の概要：

ヒトの体はさまざまな細胞で構成され、細胞が恒常性を保つことで健康に維持されている。細胞の恒常性には、細胞内で合成されたタンパク質や脂質などが機能すべき場所へ正しく運ばれることが重要である。細胞内で新規に合成された膜タンパク質などは細胞のなかのゴルジ体に一旦集積され、選別が行われた後、それぞれの場所へと輸送されていく。本研究では、ゴルジ体を中心としたタンパク質の輸送経路において重要な役割を果たすあるタンパク質の分子機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：小胞輸送、メンブレントラフィック、ゴルジ体、低分子量 GTPase

1. 研究開始当初の背景

(1) 私たちおよび他のグループの研究により、低分子量 GTPase である ARF の活性化因子 BIG1 や BIG2 がエンドソームで機能していることが示唆されたが、具体的にどの経路をどのように調節しているかは不明であった。

(2) また、ARF の不活性化因子である ARFGAP1 の相同性の高い ARFGAP2, ARFGAP3 を database から見出したが、その機能は全く不

明であった。

(3) 低分子量 GTPase ARF ファミリーの ARFRP1 の欠損マウスは胎生致死であることから発生段階を含む生命の恒常性に必須であることが示唆されていた。しかしながら、その細胞内での機能は全く不明であった。

(4) 近年、私達や他のグループの研究により ARFRP1 は ARL1 (ARF ファミリーの低分子量 GTPase) の上流で機能していることが示

唆された。しかし、その分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

(1) ARF1/3 の活性化因子である BIG1, BIG2 が関与する輸送経路の同定とその分子機構

(2) 新規 ARF の不活性化因子、ARFGAP2, ARFGAP3 の機能解析

(3) ARFRP1 と ARL1 のクロストークのメカニズムを明らかにする。

(4) ARFRP1 と ARL1 によるゴルジ体以降の輸送経路の制御における分子機構を明らかにする。

(5) ARFRP1 と ARL1 の結合タンパク質の同定とその機能解析

3. 研究の方法

(1) ARF の活性化因子、不活性化因子、ARFRP1, ARL1 とこれらの下流因子の RNAi 法を用いたノックダウンによる細胞内オルガネラの変体変化やタンパク質の局在変化を調べる。

(2) (1) で述べたノックダウンによる輸送経路への影響を解析する。

① ゴルジ体から細胞膜までの輸送は EGFP タグのついた VSVGts045 を用いて調べる。

② エンドサイトーシス経路は蛍光標識したトランスフェリン、EGF を用いて調べる。

③ エンドソームからゴルジ体までの輸送は蛍光標識した志賀毒素の B フラグメントを用いて調べる。また、FLAG-TGN38 や CD4-Furin の発現している細胞株を樹立し、FLAG や CD4 の抗体を用いてエンドソームとゴルジ体間の輸送を調べる。

④ 小胞体とゴルジ体間の輸送は VSVG-ts045-KDEL receptor のキメラタンパク質を用いて調べる。

(3) ARFRP1 あるいは ARL1 の関与する積み荷タンパク質の輸送をタイムラプスを用いてその動態を解析する。

(4) ARFRP1 の affinity column を用いてその結合タンパク質を同定する。

4. 研究成果

(1) 私たちや他のグループにより ARFRP1 は ARL1 の上流で機能することが知られていたが、それぞれ独立した輸送経路を調節していることが分かった。(論文②)

① ARFRP1 をノックダウンした細胞で ARL1

の局在には変化がない。また、ARL1 の effector である Golgin の局在にも影響を及ぼさないことから、ARFRP1 は ARL1 と独立した機能を持つことが示唆された。

② さらに、RNAi 法による解析により、ARFRP1 は VSVG のゴルジ体から細胞膜への順行輸送に (図 1, 4)、ARL1 は志賀毒素のエンドソームからゴルジ体への逆行輸送に関与していることが分かった (図 2, 4)。つまり、図 1 のように 15 分、30 分 chase をするとコントロールや ARL1 のノックダウンした細胞では VSVG が徐々に細胞膜まで輸送されるが、ARFRP1 をノックダウンした細胞では輸送が顕著に阻害された。一方、図 2 のように 30 分間蛍光標識した志賀毒素を取り込ませるとコントロールや ARFRP1 のノックダウンした細胞では志賀毒素がゴルジ体まで輸送されていくが、ARL1 のノックダウンした細胞ではその輸送が阻害された。

(2) ARL1 の下流には膜融合に必要な SNARE タンパク質、Syntaxin 6, Syntaxin 16, Vtila が機能していることが分かった。

① ARL1 のノックダウンした時、ゴルジ体に局在するこれらの SNARE がゴルジ体からなくなることが分かった。(論文②)

② さらに Syntaxin 6, Vtila をノックダウンした時、ARL1 のノックダウンと同じように志賀毒素のエンドソームからゴルジ体への輸送が阻害されることが分かった。(図 3, 4) コントロールや Vtilb のノックダウンでは影響がなかった。

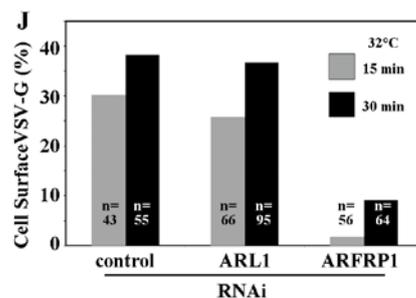


図 1. ARFRP1 のノックダウンによる VSVG のゴルジ体から細胞膜への輸送阻害

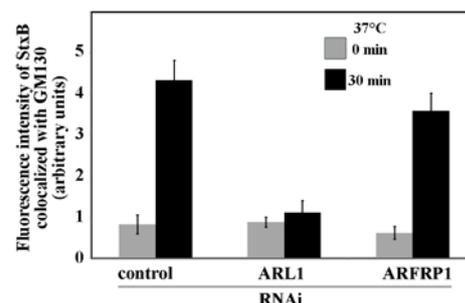


図 2. ARL1 のノックダウンによる志賀毒素のエンドソームからゴルジ体への輸送阻害

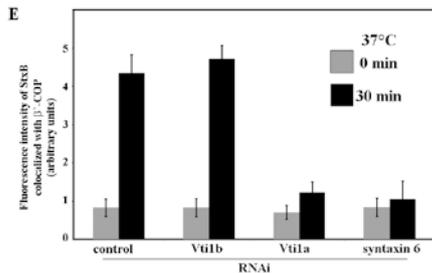


図3. Syntaxin 6とVti1aのノックダウンによる志賀毒素のエンドソームからゴルジ体への輸送阻害

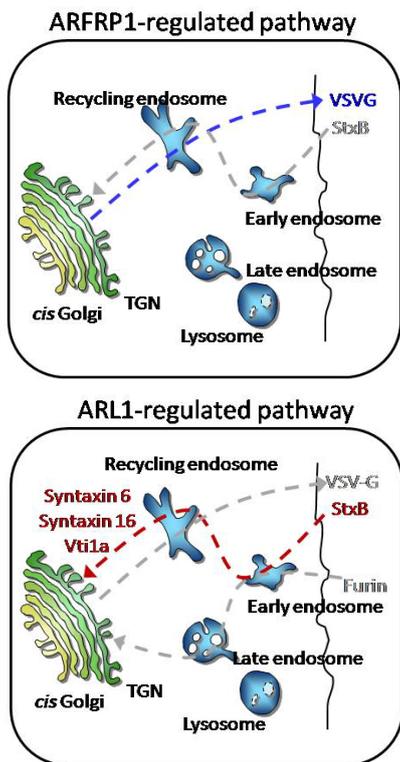


図4. ARL1とARFRP1の関与する細胞内輸送経路

(3) ARFRP1のAffinity columnから小胞輸送に関与するさまざまなタンパク質が見つかった。本研究ではARFRP1の関与する輸送過程でのこれらのタンパク質の機能は解析できなかったが、これは今後の課題である。

(4) ARF1/3の活性化因子BIG1, BIG2はCD4-Furinのエンドソームからゴルジ体への輸送に関与することが分かった。さらにこの下流にはクラスリン/アダプタータンパク質であるAP-1が機能していることが分かった。(論文④)

(5) ARF1の新規不活性化因子である

ARFGAP2, ARFGAP3はARFGAP1とredundantにKDEL receptorのゴルジ体から小胞体への輸送に関与することが分かった。この経路はCOPIコートタンパク質依存的であることを明らかにした。(論文①)

(6) ARFファミリー低分子量GTPaseのARF1/3, ARL1, ARFRP1はいずれも主にゴルジ体に局在し、機能していることは示唆されていた。しかしながら、ARL1やARFRP1に関してはゴルジ体を中心とするどの輸送経路にかかわっているのか、またどのような因子がかかわっているのかは不明であった。

本研究では、ARL1やARFRP1がそれぞれ巡回輸送、逆行輸送に関与することを明らかにし、さらにARL1の下流に一群のSNAREが機能していることを明らかにした。

また、ARFは主にゴルジ体に局在するが、本研究によってfurinのエンドソームからゴルジ体への逆行輸送に関与することが明らかとなった。

このように、ゴルジ体を中心としてエンドソーム、細胞膜の間の輸送経路における制御機構が明らかになることは、タンパク質の分泌や分解の人為的な制御を考える上での基盤となり、学術的基礎にとどまらず、医学・薬学などにも応用されることが期待される。

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5件)

* The first two authors equally contributed.

- ① Saitoh, A. *, Shin, H. -W. *, Yamada, A., Waguri, S., & Nakayama, K. (2009) Three homologous ArfGAPs participate in COPI-mediated transport. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13948-13957. 査読有
- ② Nishimoto-Morita, K. *, Shin, H. -W. *, Mitsuhashi, H., Kitamura, M., Zhang, Q., Johannes, L., & Nakayama, K. (2009) Differential effects of depletion of ARL1 and ARFRP1 on membrane trafficking between the trans-Golgi network and endosomes. *J. Biol. Chem.*, **284**, 10583-10592. 査読有
- ③ Azuma, Y., Takada, M., Shin, H. -W., Kioka, N., Nakayama, K., & Ueda, K. (2009) Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes Cells*, **14**, 191-204. 査読有
- ④ Ishizaki, R. *, Shin, H. -W. *, Mitsuhashi, H. & Nakayama, K. (2008)

Redundant Roles of BIG2 and BIG1, Guanine-nucleotide Exchange Factors for ARFs, in Membrane Traffic between the TGN and endosomes. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2650-2660. 査読有

- ⑤ Yanagida-Ishizaki, Y., Takei, T., Ishizaki, R., Imakagura, H., Takahashi, S., **Shin, H.-W.**, Katoh, Y. & Nakayama, K. (2008) Re-recruitment of Tom1L1/Scram to endosomes and the midbody by Tsg101. *Cell Struct. Funct.* **33**, 91-100 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hye-Won Shin, Dual interaction of Rab11-FIP/Arfophilin with Rab11 and ARFs and its role in membrane traffic, 2007. 5. 28-30, 日本発生生物学会・日本細胞生物学会合同大会、福岡国際会議場、福岡。
- ② 申 惠媛、エンドサイトーシスにおける低分子量 GTPase ARF1/3 の役割、BMB 2007. 12. 11-15、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、パシフィコ横浜、横浜。
- ③ Hye-Won Shin, Distinct and redundant functions of BIG1 and BIG2 in TGN and recycling endosome, FASEB Summer Research/CNRS Conference 'ARF family GTPases', 2007. 6. 23, Il Ciocco, Italy.
- ④ 西本 樹理加、TGN 以降の膜輸送における ARFRP1 と ARL1 の非依存的機能、日本細胞生物学会、2008. 6. 29-7. 1、パシフィコ横浜、横浜。
- ⑤ Hye-Won Shin, ARL1 and ARFRP1 independently regulate membrane trafficking 'to' and 'from' the TGN, 2008. 9. 4-9, University of Pavia, Italy.