

機関番号：	32659
研究種目：	若手研究 (B)
研究期間：	2009 ~ 2010
課題番号：	21770150
研究課題名 (和文)	Arf低分子量G蛋白質とその制御因子群による受容体輸送と細胞骨格再編機構の解明
研究課題名 (英文)	Regulation of receptor trafficking and cytoskeleton by Arf small G proteins and their effectors
研究代表者	
	井上 弘樹 (INOUE HIROKI)
	東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：	10294448

研究成果の概要 (和文)：

Arf 低分子量 G タンパク質とそのエフェクター分子である ASAP1 および FIP3 が増殖因子受容体のエンドサイトーシスおよびアクチン細胞骨格再編において機能する可能性について、マウス繊維芽細胞 NIH3T3 を PDGF 刺激した際に生じる Circular dorsal ruffles (CDRs) 形成と PDGF 受容体のエンドサイトーシスをモデル系として検討した。Arf GTPase activating protein である ASAP1 は、過剰発現により CDRs を消失させることから、CDR の形成を負に制御することが知られていた。本研究では ASAP1 の結合因子である FIP3 が CDRs の形成と PDGF 受容体のエンドサイトーシスを正に制御することを見出した。また、Arf および Rab 低分子量 G タンパク質のうち、少なくとも Arf3, Arf6, Rab4, Rab11 が CDRs に局在することを見出した。以上のことから、FIP3 はこれら Arf, Rab とともにアクチン細胞骨格再編と受容体エンドサイトーシスのクロストークに関わる分子の一つであることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

ASAP1 and FIP3 are effectors and/or regulators of Arf and Rab small G proteins. In this study, the possibility that they are involved in actin cytoskeleton regulation and endocytosis of growth factor receptor was evaluated. For the purpose of this, circular dorsal ruffles formation and PDGF receptor endocytosis was used as a model system. ASAP1 has been proposed to be a negative regulator for CDR formation because its overexpression down-regulates CDR formation. In this work, FIP3, which is an ASAP1-interacting protein, was identified as a positive regulator for CDR formation and PDGF endocytosis. Some of Arf and Rab proteins were localized in CDRs. Taken together, FIP3 may play a role in a crosstalk between actin remodeling and receptor endocytosis as one of key molecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：膜輸送と輸送タンパク質

1. 研究開始当初の背景

Arf 低分子量 G タンパク質は、Ras スーパーファミリーのサブファミリーで、哺乳動物ゲノム中には Arf1 から Arf6 まで 6 種類の Arf タンパク質をコードする遺伝子が存在している。Arf も他の G タンパク質と同様、GDP 結合型と GTP 結合型をサイクリングしており、このサイクリンはグアニンヌクレオチド交換因子 (Guanine nucleotide Exchange Factor; GEF) と GTP 加水分解促進タンパク質 (GTPase-Activating Protein; GAP) により制御されている。一般に、G タンパク質は GTP 結合状態で種々のエフェクター分子と相互作用し、その機能を発揮すると考えられている。GAP は GTP 加水分解を促進するためこれまで G タンパク質の抑制因子であると考えられてきたが、最近になって少なくとも一部の Arf GAP は Arf のエフェクターとして機能することが示唆されている。それは、一部の Arf GAP が小胞輸送の積み荷分子と直接結合したり、細胞膜を変形させる活性を持つことが明らかになってきたことに依っている。Arf GAP はヒトゲノム中に 31 種類存在することが知られているが (Kahn, Bruford, Inoue et al., (2008) JCB 182, 1039), その中でも ASAP1 はもっとも解析が進んだ Arf GAP の一つである。ASAP1 は分子中央の Arf GAP ドメインに加え、脂質やタンパク質と相互作用する種々の機能ドメインを有している。特に C 末端側の Proline-rich や SH3 ドメインを介して Focal adhesion kinase (FAK) や Cortactin といった細胞接着や細胞骨格の制御に関わる因子と直接結合することから、ASAP1 は細胞接着や細胞運動において機能すると考えられてきた。実際に、ASAP1 は繊維芽細胞において PDGF 刺激によって誘導されるアクチン細胞骨格の再編部位である Cicular Dorsal Ruffles (CDRs) に局在し、過剰発現によりその形成を抑制することが知られている (Randazzo et al., (2000) PNAS 97, 4011)。しかし、それらがどのような機序に依っているのかは明らかになっていない。CDRs には ASAP1 に加え、アクチンの重合に関わる Cortactin や WAVE, その上流に位置し、シグナル伝達を司る Rac, PAK, シグナル伝達脂質代謝酵素 PI3 キナーゼ, 細胞接着分子 Paxillin, エンドサイトーシス時の小胞形成に重要な Dynamin など非常に多くの分子が集積している (McNiven, (2006) TICB 16,

487)。さらに、GFP と融合した EGF レセプターを安定発現した細胞においては、有意な量のレセプターが CDRs 周辺でエンドサイトーシスされることが最近報告された。すなわち、CDRs は増殖因子の刺激によって起こる二つのイベント、アクチン細胞骨格の再編とレセプターのエンドサイトーシスの接点にあたると思われることができる。

ASAP1 の N 末端側には細胞膜の変形を認識または誘導するドメインとして現在注目されている BAR ドメインが存在しており、実際に ASAP1 の BAR ドメインも Arf1 と協同的に人工合成したリポソームをチューブ状に変形させる活性を有することが申請者が所属したグループにより報告されている (Nie et al., (2006) Curr. Biol. 16, 130)。一方で、本研究代表者らは、ごく最近、ASAP1 の BAR ドメインに Rab11-Family Interacting Protein 3 (FIP3) と呼ばれるタンパク質が直接結合し、ホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (PI(4, 5)P₂) 依存的に ASAP1 の Arf1 に対する GAP 活性を上昇させることを見出した (Inoue et al., (2008) MBC 19, 4224)。さらに、ASAP1 は FIP3 と共にリサイクリングエンドソームで機能し、その核近傍への局在化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。FIP ファミリーのタンパク質はエンドサイトーシスされた分子のリサイクリングに機能する Rab11 と結合し、そのエフェクター分子として機能すると考えられている。FIP3 は Rab11 に加え、Arf5, Arf6 とも結合する。このように、ASAP1-FIP3 複合体は小胞輸送に関わる多様な分子と相互に結合しながら機能を発揮しているものと考えられる。これまで、FIP3 はもとより Rab11, FIP ファミリーの分子が直接、細胞骨格制御に機能することを報告した例はないが、ASAP1 との結合を考えれば FIP3 がアクチン細胞骨格制御、特に CDR 形成とそれに伴うレセプターのエンドサイトーシスに関与している可能性は低いと考えた。

FIP3 が直接結合する Arf6 は主に形質膜とリサイクリングエンドソームで働く Arf アイソフォームで、ホスファチジン酸 (PA) 依存的にホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼを活性化し PI(4, 5)P₂ を産生する。PI(4, 5)P₂ はさらに PI3 キナーゼにより PI(3, 4, 5)P₃ となる。ASAP1 の良い基質である GTP 結合型 Arf1 は、ホスホリパーゼ D を活性化し、PA を産生する。すなわち、FIP3,

ASAP1 とともに Arf を介して PI(3, 4, 5)P₃ の産生を制御する。CDR 形成は Wortmannin により完全に阻害されることから PI3 キナーゼによる PI(3, 4, 5)P₃ の産生が必須であると考えられる。以上のように CDR 形成において脂質代謝によるシグナリングはきわめて重要な位置を占めると考えられるがこれまでこの点に注目して行われた研究はほとんどない。本研究代表者が所属する研究室では長年、PA を分解するホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) と小胞輸送の関係について取り組んでおり、本研究においてその蓄積を生かし、CDR 形成とエンドサイトーシスにおける脂質シグナリングについてもその一端を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

「1. 研究開始当初の背景」で述べた仮説のうち本研究では主に以下の点について明らかにすることを目指した。

- (1) FIP3 が ASAP1 同様、PDGF 刺激によって誘導される CDRs に集積するか否か。
- (2) FIP3 の過剰発現および発現抑制が CDR の形成に影響を与えるか否か。
- (3) FIP3 の発現抑制が PDGF 受容体のエンドサイトーシスに影響を与えるか否か。
- (4) Arf および Rab 低分子量 G タンパク質は CDRs に局在するか否か。するとすればどのアイソフォームが局在するか。
- (5) PA 代謝に関わるホスホリパーゼのうち、本研究ではこれまでほとんどその機能がほとんど分かっていない細胞内型ホスホリパーゼ A1 KIAA0725p に焦点を絞り、その細胞内局在部位を同定する。
- (6) KIAA0725p が関わる細胞内小胞輸送経路を同定する。

3. 研究の方法

目的を達成するため以下のような実験を行った。

- (1) 内在性 FIP3 の細胞内局在は組換えタンパク質をウサギに免疫することで作製したポリクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法（免疫染色法）で検出した。解析は共焦点レーザー顕微鏡を用いた。
- (2) FIP3 の発現抑制は siRNA をリポフェクション法により細胞に導入することにより行った。CDRs の形成は主に F-actin を Rhodamine-Phalloidin で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて計数した。
- (3) PDGF 受容体のエンドサイトーシスは、

PDGF 受容体の細胞外ドメインに対する抗体を用いた ELISA 法により定量化した。

(4) HA タグまたは GFP タグを付加した代表的な Arf および Rab タンパク質を一過的に発現させ、抗 HA 抗体または GFP 蛍光によりそれらの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて評価した。

(5) 内在性 KIAA0725p の細胞内局在は特異的抗体を用いて検出し、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

(6) KIAA0725p が機能する細胞内小胞輸送経路を同定するため、VSVG-GFP の順行輸送（小胞体→ゴルジ体→細胞膜）、BFA 処理による GT-GFP の逆行輸送（ゴルジ体→小胞体）、コレラ毒素 B サブユニットの逆行輸送（細胞膜→ゴルジ体→小胞体）を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

研究の目的に対応して、現在までに以下の結果を得た。

(1) FIP3 の一部は CDR に局在する：マウス繊維芽細胞 NIH3T3 を PDGF で処理すると極めて短時間（5～10分間）の間に CDR 形成を含むアクチン細胞骨格の再編と受容体のエンドサイトーシスが活発に起こる。ASAP1 はこの CDRs に集積する。はじめに、ASAP1 結合タンパク質である FIP3 が CDR において機能するかを明らかにするため、FIP3 が CDRs に局在するか否かについて特異的抗体を用いた免疫染色法により検討した。その結果、内在性 FIP3 は CDR 形成時も主には核近傍の Recycling endosome に局在したが、その一部が CDRs に局在することが認められた。この結果は FIP3 が CDRs の dynamics（形成と消失）またはその近傍で起こるエンドサイトーシスに関わる可能性を示唆している。

(2) FIP3 の発現抑制は CDR 形成を抑制する：siRNA のトランスフェクションにより FIP3 の発現を抑制した NIH3T3 細胞において CDRs の形成を観察した。その結果、mock または negative control siRNA を導入した細胞では PDGF 処理後約 5 分でアクチンのストレスファイバーが崩壊し、厚みのある CDRs が形成されたのに対し、FIP3 を発現抑制した細胞ではストレスファイバーの崩壊が不十分で、CDRs は形成されていても不完全で断片化したような形態を示す細胞が多く認められた。この結果は、FIP3 が PDGF 刺激によって誘導されるアクチン細胞骨格の再編を正に制御している可能性を示唆する。

(3) FIP3 の発現抑制は PDGF 受容体のエンドサイトーシス速度を低下させる： PDGF 刺激により CDRs が形成される一方で、PDGF により活性化した PDGF 受容体は細胞内へとエンドサイトーシスされる。細胞内へ移行した PDGF 受容体は、その大部分がリソソームへ輸送され分解されるが、一部は再度細胞膜へとリサイクリングされる。FIP3 はリサイクリングエンドソームに関わる因子として同定されたが、本研究において FIP3 の発現抑制が CDR 形成を部分的に抑制することが明らかになったことから、PDGF 受容体のエンドサイトーシスについても何らかの効果を持つのではないかと考えた。そこで、FIP3 の発現を抑制した細胞において、PDGF 受容体のエンドサイトーシス速度を定量した。その結果、FIP3 を発現抑制した細胞では mock または negative control siRNA を導入した細胞と比較して、約 25% エンドサイトーシス速度が低下した。このことは FIP3 が PDGF 受容体のエンドサイトーシスとアクチン細胞骨格制御のクロストークの一部を担っている可能性を示唆する。

(4) 一部の Arf および Rab 低分子量 G タンパク質は CDR に局在する： ASAP1 および FIP3 は Arf および Rab の調節因子あるいはエフェクターと考えられているが、CDRs にどの Arf および Rab アイソフォームが局在しているかは明らかになっていなかった。そこで、一過的に発現させた Arf1, Arf3, Arf5, Arf6, Rab4, Rab5, Rab11, Rab22 について CDRs に局在するか否かを検討した。その結果、Arf3 と Rab4 で他と比べ比較的強い CDRs への局在が認められた。また、Arf6, Rab11 についてもわずかではあるが有意な局在が認められた。ASAP1 および FIP3 はこれら低分子量 G タンパク質とともに CDR 形成に機能している可能性が考えられる。

(5) KIAA0725p はゴルジ体に局在する： これまで細胞内での機能がほとんど分かっていない PA 代謝酵素である KIAA0725p の内在性分子についてその細胞内局在を解析した。その結果、内在性 KIAA0725p はその大部分が細胞質に存在しているものの、一部はゴルジ体、特に cis-ゴルジ嚢の局在していることが明らかとなった。

(6) KIAA0725p はゴルジ体から細胞膜への輸送を制御する： KIAA0725p が細胞内小胞輸送経路のうちどこで機能しているかを明らかにするため、KIAA0725p の発現を抑制した HeLa 細胞を用いて、モデル積み荷分子の輸送実験を行った。検討した VSVG-GFP の順行輸送 (小胞体→ゴルジ体→細胞膜)、BFA 処理による GT-GFP の逆行輸送 (ゴルジ体→小胞体)、

コレラ毒素 B サブユニットの逆行輸送 (細胞膜→ゴルジ体→小胞体) のうち、VSVG-GFP のゴルジ体から細胞膜への順行輸送のみで有意な輸送の遅延が認められた。すなわち、KIAA0725p はこの経路を正に制御する機能をもつことが示唆される。

KIAA0725p が Arf の制御下にある可能性を検討するため Arf1 を一過的に過剰発現した細胞での KIAA0725p の細胞内局在を観察した。その結果、KIAA0725p の局在に目立った変化は認められなかった。現在、KIAA0725p が CDRs 形成と受容体のエンドサイトーシスに関わる可能性について検討を行っている。

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 2 件)

Sato, S., * Inoue, H., * Kogure, T., Tagaya, M., and Tani, K. (*, These authors contributed equally to this work.) Golgi-localized KIAA0725p regulates membrane trafficking from the Golgi apparatus to the plasma membrane in mammalian cells. FEBS lett. 584, 4389-4395 (2010) 査読有り

Mazelova, J., Astuto-Gribble, L., Inoue, H., Tam, B. M., Schonteich, E., Prekeris, R., Moritz, O. L., Randazzo, P. A., Deretic, D. Ciliary targeting motif VxPx directs assembly of a trafficking module through Arf4. EMBO J. 28, 183-192 (2009) 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

米川周佑、中島寿基、井上弘樹、多賀谷光男、谷佳津子; Sec16B はミトコンドリアおよびペルオキシソームの形態形成に関与する; 日本生化学会 第 82 回大会 2009 年 10 月 (神戸)

[その他]

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/Life-Science/lmcb-6/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 弘樹 (INOUE HIROKI)
東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：10294448

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し