

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770203

研究課題名（和文） ゴルジ体以降の膜輸送における Rab14 とそのエフェクターの調整機構

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of Rab14 and its effector proteins in post-Golgi membrane trafficking

研究代表者

申 惠媛 （SHIN, Hye-Won）

京都大学・生命科学系キャリアパス形成ユニット・特定助教

研究者番号：10345598

研究成果の概要（和文）：

本研究で Rab14 の結合タンパク質として、Rab4 の結合因子として知られていた RUFY1 を同定した。RUFY1 がエンドソームで Rab14 や Rab4 と共局在することや RUFY1 が Rab14 や Rab4 と異なる領域を介して結合すること、RUFY1 のエンドソームへの局在は Rab4 ではなく Rab14 を介することを明らかにした。また、RUFY1, Rab14, Rab4 がトランスフェリンのエンドソームから細胞膜へのリサイクリングの経路を調節することを明らかにした。本研究では、RUFY1 がその共通の結合因子として Rab14 と Rab4 を機能的にリンクさせていることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Here, we report that Rab14 binds in a GTP-dependent manner to RUFY1/Rabip4, which had been originally identified as a Rab4 effector. Rab14 colocalizes well with Rab4 on peripheral endosomes. Depletion of Rab14, but not Rab4, causes dissociation of RUFY1 from endosomal membranes. Coexpression of RUFY1 with either Rab14 or Rab4 induces clustering and enlargement of endosomes, while a RUFY1 mutant lacking the Rab4-binding region does not induce a significant morphological change in the endosomal structures even when coexpressed with Rab14 or Rab4. These findings suggest that Rab14 and Rab4 act sequentially, together with RUFY1; Rab14 is required for recruitment of RUFY1 onto endosomal membranes, and subsequent RUFY1 interaction with Rab4 may allow endosomal tethering and fusion. Depletion of Rab14 or RUFY1, as well as Rab4, inhibits efficient recycling of endocytosed transferrin, suggesting that Rab14 and Rab4 regulate endosomal functions through cooperative interactions with their dual effector, RUFY1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：生物学・細胞生物学

キーワード：細胞、メンブレントラフィック、小胞輸送、低分子量 GTPase、エンドソーム

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 TGN 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。応募者は、複雑な輸送経路の中で、未解明な部分の多い TGN 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 ARF は小胞の形成に、Rab は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 や Rab はそれぞれ特異的なオルガネラに局在し、活性化された GTP 結合型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。したがって ARF や Rab とその特異的なエフェクター分子の作用機構を明らかにすることは輸送過程を理解することにつながる。

2. 研究の目的

Rab14 がエンドソームとゴルジ体の両方に局在することが分かった。そこで、Rab14 がゴルジ体とエンドソームを結ぶ重要な役割を果たしていると考え、Rab14 と結合するタンパク質の同定し、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

1. 研究の方法

- (1) 酵母 two-hybrid スクリーニングによる Rab14 結合因子の同定
- (2) 相互作用の生化学的検証と分子レベルでの解析

Rab14 と (1) で同定された RUFY-1 の相互作用を GST pull down 法により、生化学的に検証した。さらに、RUFY-1 に関しては、Rab14 や Rab4 と相互作用に必要なドメインを酵母 two-hybrid 法や GST pull down 法などを利用して決定した。

- (3) 抗体の作製

Rab14 の recombinant protein を用いて特

異的な抗体の作製に成功した。

- (4) 細胞内での相互作用の解析

Rab14 と RUFY-1 の細胞内での局在を蛍光抗体法により調べた。さらに Rab14 の変異体の発現あるいは RNAi 法を用いた Rab14 のノックダウンによる RUFY-1 の局在の変化を調べた。また、細胞内での相互作用を免疫沈降法を用いて検証した。

- (5) エンドソームでの Rab14 による輸送の制御機構

Rab14 の変異体や、RUFY-1 の Rab4 との結合できない変異体などを発現させ、エンドソームを介する輸送経路やエンドソームの形態を蛍光抗体法で観察した。これらの輸送を調べるためには、蛍光で標識した積み荷 (transferrin, EGF) を用いた。さらに、Rab14, RUFY-1 のノックダウンによる影響も同様に調べた。

4. 研究成果

- (1) Rab14 を用いた酵母 2-hybrid スクリーニングの結果、Rab4 の結合因子である RUFY1 を同定した。Rab14 や Rab4 は RUFY1 の異なる領域に結合することを pull down 法により確認した。

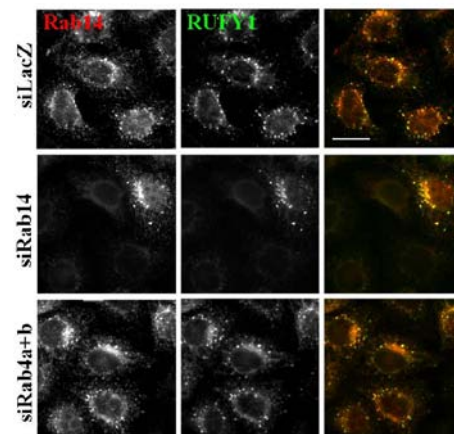


図 1.

- (2) RUFY1 はエンドソームに局在し、Rab14 や Rab4 と良く共局在した。この RUFY1 のエンドソームへの局在は Rab4 ではなく Rab14 に依存的であることが Rab4 や Rab14 のノックダウンにより明らかとなった。(図 1)

(3) RUFY1 と Rab14 あるいは RUFY1 と Rab4 を共発現させるとエンドソームが肥大化することが分かった。この時にエンドソームはブドウのように集まってクラスターを作っていることが画像の deconvolution により明らかとなった。(図 2)

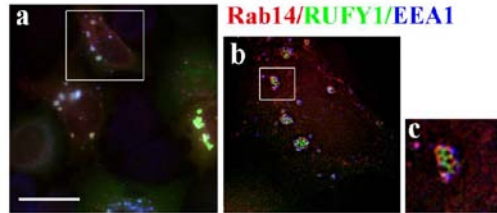


図 2.

(4) さらにこのエンドソームの肥大化は Rab4 と結合できない RUFY1 との共発現では見られないことから、エンドソームの肥大化は Rab4 によるものであることが示唆された。(図 3)

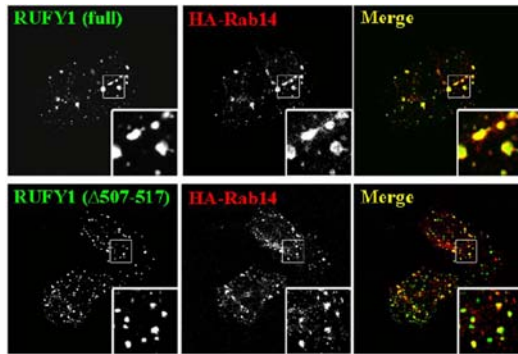


図 3.

(5) Rab14, Rab4, RUFY1 のノックダウンした細胞ではトランスフェリンの初期エンドソームから細胞膜へのリサイクリングが遅れていることが分かった。(図 4)

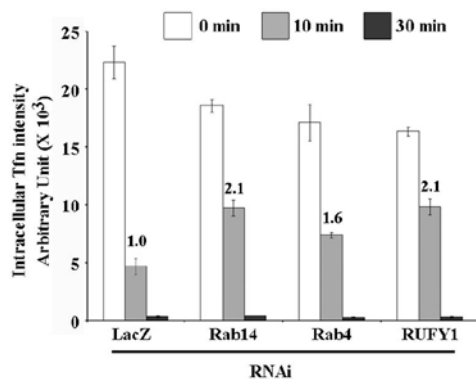


図 4.

(6) これらのことから、RUFY1 は Rab14 によってエンドソームにリクルートされ、さらに Rab4 の相互作用することでエンドソームの

繫留や融合を調節していると考えられる。さらに RUFY1 を介する Rab14 と Rab4 のクロストークはトランスフェリンの輸送を調節していることが明らかとなった。(図 5)

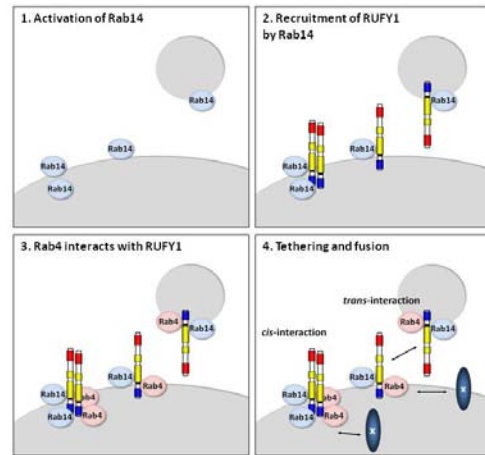


図 5.

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)

§ Corresponding author

* Equal contribution

- Man, Z., Kondo, Y., Koga, H., Umino, H., Nakayama, K., and Shin, H.-W. (2010) Arfaptins are localized to the trans-Golgi by interaction with Arl1, but not Arfs. *J. Biol. Chem.* In press. 査読有
- Yamamoto, H., Koga, H., Katoh, Y., Takahashi, S., Nakayama, K., and Shin, H.-W. § (2010) Functional cross-talk between Rab14 and Rab4 through a dual effector, RUFY1/Rabip4. *Mol. Biol. Cell*, 21, 2746-2755. 査読有
- 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
- 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
- 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

[学会発表] (計 5 件)

1. **Hye-Won Shin**, Small GTPase ARF3 is involved in lysosomal degradation pathway. 2009.6.2. 第 61 回日本細胞生物学会大会、名古屋国際会議場
2. **Hye-Won Shin**, RUFY1 (Rabip4) による Rab14 と Rab4 のクロストーク. 2009.11.10. 第 1 回細胞内ロジスティクス全体班会議、ANA インターコンチネンタル万座ビーチリゾート、沖縄
3. **Hye-Won Shin**, Roles of Small GTPase ARF1 and ARF3 in recycling endosomes. 2010.8.18. FASEB meeting 'Arf small GTPases', アメリカ合衆国、アリゾナ、Carefree
4. **Hye-Won Shin**, RUFY1/Rabip4 を介した Rab14 と Rab4 のクロストーク. 2010.12.8. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学会合同大会)、神戸ポートアイランド
5. **Hye-Won Shin**, Functional crosstalk between Rab14 and Rab4 through a dual effector, RUFY1/Rabip4. 2010.12.14. 50th Annual meeting of American Society for Molecular Cell Biology, アメリカ合衆国、フィラデルフィア

[その他]

ホームページ等

<http://www.cp.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・生命科学系キャリアパス形成ユニット・特定助教

研究者番号：10345598