

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570174

研究課題名(和文) Rab11結合タンパク質とホスファチジン酸代謝による受容体輸送機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of receptor trafficking by a phosphatidic acid-interacting Rab11 effector and their regulators

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん細胞において遺伝子増幅が知られるホスファチジン酸(PA)の代謝酵素であるDDHD2/KIAA0725pがイノシトールリン脂質に結合すること、また、PAに結合するRab11エフェクターFIP5の相互作用因子であるgamma-SNAPがSNARE複合体の解離能を有すること、さらに、上皮成長因子受容体EGFRやトランスフェリン受容体TfRのエンドサイトーシスにおいて、特に、初期エンドソームからの輸送に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that DDHD2/KIAA0725p, phospholipase A1 against phosphatidic acid (PA), interacts with phosphatidylinositol 4-phosphate, thereby being recruited to ERGIC/Golgi. Moreover, this study showed that gamma-SNAP, which is a binding partner of PA-interacting Rab11 effector Rab11-FIP5, functions in disassembly of SNARE complex and regulates the trafficking of epidermal growth factor receptor and transferrin from early endosomes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物機能化学

キーワード：小胞輸送 上皮成長因子受容体 トランスフェリン受容体 SNARE gamma-SNAP DDHD2 KIAA0725p Rab11-FIP5

1. 研究開始当初の背景

動物細胞の細胞膜に存在する鉄結合タンパク質トランスフェリンの受容体 (TfR) や細胞外基質フィブロネクチンの受容体であるインテグリンは、リガンドの結合や細胞運動に伴って細胞膜からエンドサイトーシスされ、細胞内のリサイクリングエンドソーム (RE) を経由して再び細胞膜に輸送され再利用される。上皮成長因子 (EGF) などの増殖因子の受容体は大部分がリソソームを終点とする分解経路に向かうが、一部は同様に細胞膜へリサイクリングされることが知られている。これらリサイクリングの小胞輸送を司るマスター分子の一つが、低分子量 G タンパク質 Rab11 である。Rab11 には Rab11A, Rab11B, Rab25/Rab11C の3つのアイソフォームが存在し、エフェクター分子と相互作用することによりその機能を発揮する。Rab11 Family Interacting Proteins (FIPs) は Rab11 と結合することを指標に同定された分子群で、FIP1 から FIP5 まで5種が存在する。そのうち、FIP5 は Rab11 以外に、モータータンパク質と結合し、さらに、N 末端の C2 ドメインを介してホスファチジン酸 (PA) およびホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PtdIns(3,4,5)P₃) に結合することが知られる。PA および PtdIns(3,4,5)P₃ は、増殖因子等の刺激により細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーとして細胞膜上で作られる。

近年、一部の乳がんおよび卵巣がんにおいて Rab25 の遺伝子座周辺(1q22 領域)が増幅し、その発現量の昇ががんの悪性度と強く相関していることが報告された (Cheng et al. (2004) Nat. Med. 10, 1251)。また、一部の乳がんでは FIP1 遺伝子が存在する染色体領域 (8p11-12) でも増幅が認められている (Belsi-Boyer et al. (2005) Mol. Cancer Res. 3, 655)。乳がん細胞で増幅が見られる染色体 8p11-12 領域には、FIP1 以外にも多くの遺伝子が存在する。そのうち、KIAA0725p は PA を良い基質とするホスホリパーゼ A1 で、in vitro では細胞膜の PA 濃度を下げうる活性をもつ。ごく最近、申請者らは、KIAA0725p がゴルジ体-細胞膜間の小胞輸送に関与することを明らかにした (Sato et al. (2010) FEBS Lett. 584, 4389)。Class I FIPs は PA により細胞膜への局在化が制御されていることが知られており、これら PA の代謝に関わる分子が乳がん

細胞においてインテグリンや EGFR の輸送に関与している可能性が考えられた。

上述のように FIP5 は Rab11 に加え、モータータンパク質 KIF3B や糖輸送担体 GLUT4 の輸送に関わる ASI60 とも結合する。さらに、Chen らと連携研究者の多賀谷らはそれぞれ独立に、これまで機能がほとんど分かっていない γ -SNAP が FIP5 と結合することを報告した (Chen et al. (2001) 276, 13127; Tani et al. (2003) JBC 278, 13531)。 γ -SNAP は、膜融合マシナリー SNARE と NEM sensitive factor (NSF) を繋ぐ α -SNAP のアイソフォームであるが、 α -SNAP と異なり解析された SNARE とは結合しないことが報告されていた。本研究では、この γ -SNAP が FIP5 と協調的に EGFR 等の受容体分子の細胞内輸送に関わる可能性について解析することを目指した。

2. 研究の目的

ヒトをはじめとする高等動物の細胞は、細胞膜上に増殖因子や細胞外基質に対する多様な受容体を発現しており、それらの厳密な制御は細胞の生理的応答のみならず、がん等の病理現象とも深く関わっている。Rab11-FIP は、低分子量 G タンパク質 Rab11 の結合タンパク質として細胞膜への受容体の輸送に関与することが示唆されている。しかしながら、その機能および分子機構には未解明の点が多く残されている。本研究では、Rab11-FIP のうち細胞膜の酸性脂質であるホスファチジン酸と結合する FIP5 に焦点をあて、乳がん細胞において遺伝子増幅が知られるホスファチジン酸代謝酵素 KIAA0725p と FIP5 結合因子である γ -SNAP を介した受容体輸送制御の機構を分子レベルで明らかにすることを目指す。

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) KIAA0725p の phosphatidylinositol などの他の脂質に対する結合能を解析するため、SF9 細胞において His タグを付加した KIAA0725p を発現させ、Ni-bead を用いて精製した。精製 KIAA0725p をニトロセルロー

ス膜にプロットした phosphatidylinositol を反応させ、その結合をイムノプロテイングにより解析した。

(2) KIAA0725p とその変異体の細胞内局在を解析するため、エピトープタグを付加した KIAA0725p を HeLa 細胞に発現させ、オルガネラマーカに対する抗体と共にタグに対する抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

(3) KIAA0725p の PA に対するホスホリパーゼ A1 活性を解析するため、基質として ³²P 標識した 1,2-dioleoyl-sn-phosphatidic acid (DOPA) を調製した。KIAA0725p の野生型および変異体は GST タグを付加し、293T 細胞で発現させ、グルタチオンビーズで回収後、そのまま酵素として DOPA を基質としたホスホリパーゼ A1 活性の測定に用いた。用いた酵素は、後にイムノプロテイングにより定量化を行い比活性を算出した。

(4) gamma-SNAP の結合因子を同定するため、3xFLAG タグを付加した gamma-SNAP を 293T 細胞で発現させ、FLAG-bead で沈降、3xFLAG ペプチドでの溶出、SDS-PAGE で分離、銀染色で検出した。検出された特異的なバンドを質量分析により解析し、結合タンパク質の候補を同定した。本解析は大阪大学の奥崎博士との共同研究により行った。

(5) gamma-SNAP の SNARE 複合体に対する解離活性を評価するため、GST タグを付加した SNARE を 293T 細胞で発現させ、内在性の SNARE パートナーとの複合体として回収した。そこに、別途大腸菌の発現系を用いて精製した gamma-SNAP、NSF を添加して SNARE 複合体の解離をイムノプロテイングにより検出した。

(6) EGFR-GFP および蛍光表指揮したトランスフェリンのエンドサイトーシスおよび分解およびリサイクリングの解析は共焦点レーザー顕微鏡による画像解析、および、フローサイトメトリーを用いた解析により行った。

4. 研究成果

(1) ホスファチジン酸ホスホリパーゼ A1 KIAA0725p/DDHD2 に関する解析

KIAA0725p は PI4P 依存的に

ERGIC/Golgi に局在化する

乳がん細胞において遺伝子増幅が知られるホスファチジン酸代謝酵素の一つである KIAA0725p の局在または活性がシグナリングリピットである phosphatidylinositol などの他の脂質により制御されている可能性を探るためニトロセルロース膜にプロットした phosphatidylinositol に対する結合を解析した。その結果、KIAA0725p が phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) を含む phosphatidylinositol monophosphate に結合することが明らかとなった。

さらに、KIAA0725p の PI4P 結合部位を明らかにするため、ドメインごとの欠失変異体を作製し、その結合能を解析したところ分子の C 末端半分に位置する SAM ドメインと DDHD ドメインの双方が必須であることが示された。PI4P は負電荷をもつ脂質であるため、SAM ドメインに存在する正電荷クラスターに変異を導入したところ予想通り PI4P に対する結合能を失った。

KIAA0725p は主に小胞体-ゴルジ体中間区画 (ERGIC) と Golgi 体に局在するが、この正電荷クラスターに変異をもつ KIAA0725p はこれらオルガネラへの局在化能を失い、ほぼ細胞質に局在化した。

以上のことから、KIAA0725p は PI4P に結合し、それによりその局在が制御されていることが明らかとなった。

KIAA0725p の DDHD ドメインは自身のホスホリパーゼ A1 活性に対し必須の機能を有する

DDHD ドメインは脂質代謝に関わる多くのタンパク質が有するドメインであるがその機能についてはこれまでほとんど明らかになっていなかった。そこで、KIAA0725p の欠失変異体を用いてその PA に対するホスホリパーゼ A1 活性を評価したところ、DDHD ドメインが活性に必須であることが示された。さらに、DDHD ドメインの名前の由来でもある保存された 3 つのアスパラギン酸と一つのヒスチジン残基の変異体についても同様に活性を解析したところ、これらの内、2 つのアスパラギン酸とヒスチジンの変異で活性が完全に失われた。一方、上述の SAM ドメインの変異体では活性に変化は認められなかった。

以上のことから、これまでその機能が未知であった SAM-DDHD タンデムドメインがホスホリパーゼ A1 の局在と活性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(2) gamma-SNAP はエンドソーム SNARE 複合体の解離能を有し、受容体輸送を制御する

gamma-SNAP はエンドソーム SNARE に結合し、NSF とともに SNARE 複合体の解離を促進する

ホスファチジン酸と結合する FIP の一つである FIP5 と相互作用する分子の一つで、これまでその機能が十分明らかになっていなかった gamma-SNAP の機能を明らかにすることを中心に解析を行った。

gamma-SNAP は、膜融合因子 SNARE 複合体の解離因子である alpha-SNAP のアイソフォームであるが、SNARE との結合や解離活性についてはほとんど明らかになっていなかった。今回、gamma-SNAP の機能を明らかにする目的で、その結合タンパク質を質量分析により同定したところ、複数の SNARE タンパク質が得られた。その多くはエンドソームで機能することが知られている SNARE であった。そのうち、いくつかについては gamma-SNAP との内在性同士の結合も検出できた。そこで、これら SNARE からなる複合体を、gamma-SNAP が ATPase である NSF 依存的に解離できるか否かについて検討した。その結果、gamma-SNAP はこれら SNARE 複合体に対して alpha-SNAP と同等の解離能を有することを明らかになった。

gamma-SNAP は EGFR および TfR の初期エンドソームからの輸送を制御する

上述の解析から、gamma-SNAP がエンドソームで機能する可能性が示唆されたため、初期エンドソームから分解経路およびリサイクリング経路に輸送される代表的な受容体である上皮成長因子受容体 EGFR とトランスフェリン受容体 TfR のエンドサイトーシスと分解、および、リサイクリング gamma-SNAP が機能しているかを解析した。

gamma-SNAP を発現抑制した肝臓がん細胞株 HepG2 において安定発現した EGFR-GFP の輸送と分解を免疫染色およびフローサイトメトリーにより解析したと

ころ、gamma-SNAP を発現抑制した細胞では、コントロールの細胞と比べ、EGFR-GFP の分解速度が減少しており、EGFR-GFP が初期エンドソームに長時間蓄積している様子が観察された。同様に、蛍光標識したトランスフェリン (Tfn) の輸送を解析したところ、gamma-SNAP の発現抑制により Tfn のエンドサイトーシスの遅延と初期エンドソームへの蓄積が認められた。

このような初期エンドソームへの蓄積を伴う EGFR の分解抑制と Tfn のエンドサイトーシスの遅延は、それぞれ STX8 および FIP5 の発現抑制でも起こることが報告されており、gamma-SNAP が STX8 および FIP5 とともに分解経路およびリサイクリング経路で協調的に機能することでこれら経路を制御していることが示唆された。

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3件)

1. Arasaki, K., Takagi, D., Furuno, A., Sohda, M., Misumi, Y., Wakana, Y., Inoue, H., and Tagaya, M. A new role for RINT-1 in SNARE complex assembly at the trans-Golgi network in coordination with the COG complex. *Mol. Biol. Cell* 24, 2907-2917 (2013) DOI: 10.1091/mbc.E13-01-0014

2. Inoue, H.,* Baba, T.,* Sato, S., Ohtsuki, R., Takemori, A., Watanabe, T., Tagaya, M., and Tani, K. (*, These authors contributed equally to this work.) Roles of SAM and DDHD domains in mammalian intracellular phospholipase A1 KIAA0725p. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 930-939 (2012) DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.002

3. Tani, K., Kogure, T., and Inoue, H. The intracellular phospholipase A1 protein family. *Biomol. Concepts* 3, 471-478 (2012) DOI: 10.1515/bmc-2012-0014

[学会発表](計2件)

1. 松崎友香, 田中理華, 渡邊卓也, 井上弘樹, 奥崎大介, 多賀谷光男; γ -SNAP の結合因子と細胞内小胞輸送における機能; 第 85 回日本生化学会年会, 2012 年 12 月, 福岡

2. 竹森亜弥, 井上弘樹, 馬場崇, 大槻竜也, 渡邊卓也, 多賀谷光男, 谷佳津子; 細胞内型ホスホリパーゼ A1 の SAM-DDHD ドメイン

はホスファチジルイノシトールリン酸の結合とホスホリパーゼ A1 活性に必須の領域である；第 84 回日本生化学会年会，2011 年 9 月，京都

〔図書〕(計 1 件)

Tani, K., Baba, T. and Inoue, H. The Structures and Functions of Intracellular Phospholipase A1 family proteins. In "Phospholipases in Health and Disease" Series: Advances in Biochemistry in Health and Disease, Vol. 10 (ed. Tappia, Paramjit S and Dhalla, Naranjan S.), pp. 87-99 (2014), Springer Science, Berlin, Germany

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.toyaku.ac.jp/>

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

該当なし

(3) 連携研究者

多賀谷 光男 (TAGAYA, Mitsuo)
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：30179569