

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657094

研究課題名(和文) FRETセンサーによる後期エンドソーム・リソソーム系の制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulation-mechanism of intracellular dynamics of late endosome and lysosome by using a FRET biosensor

## 研究代表者

中村 岳史 (Nakamura, Takeshi)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号：60362604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分解経路の終着点であるリソソームの動態を制御するキー分子が Rab7である。そこでFRETセンサーを開発してRab7による後期エンドソーム(LE)とリソソーム動態の制御の解析を行った。共焦点顕微鏡観察では小胞ごとのRab7活性に有意なばらつきがあり、GDP-Rab7の小胞膜上の存在がわかった。センサーとRNAi法などを組み合わせた実験結果から分解経路でのRab7活性の制御と機能について「LEでRab7はMon1/Ccz1により活性化され活性型Rab7はLEとリソソームの融合に働く。リソソームでのRab7活性化はMon1/Ccz1を介さずに起こりリソソームの核周辺への集積に働く」と結論した

研究成果の概要(英文)：Rab7 is known to be a key molecule which regulates dynamics of lysosomes, in which a variety of biomolecules and damaged organelles are destructed. In this study, I have developed a FRET sensor, Raichu-Rab7, which can visualize the spatiotemporal change of Rab7 activity in living cells. Raichu-Rab7 has shown the existence of a significant variation in Rab7 activity of individual endosomes in steady-state COS-7 cells. Next, I investigated the mechanism regulating Rab7 activity during the process from late endosomes to lysosomes in steady-state cells and macropinocytosis in EGF-stimulated COS-7 cells. Based on these studies, I have concluded that Rab7 on late endosomes is activated by Mon1/Ccz1 complex and plays an essential role in the fusion between late endosome and lysosome; on the contrary, Rab7 activation on lysosomes is independent of Mon1/Ccz1 and active Rab7 on lysosomes is implicated in the perinuclear accumulation of lysosomes.

研究分野：分子神経科学

キーワード：Gタンパク質 シグナル伝達 分解経路 リソソーム FRET

### 1. 研究開始当初の背景

Rab ファミリーG 蛋白質は細胞の生存や機能の維持に不可欠な膜輸送を制御している。中でも後期エンドソーム・リソソーム輸送系は、リサイクリング経路と並ぶ細胞内の主要幹線である。その経路における Rab 分子の役割について、現在2つの大きな問題が存在する。ひとつは初期エンドソームから後期エンドソームへの移行の中心過程である Rab5 から Rab7 への転換 (Rab スイッチ) のメカニズムについて、基本的な見直しを迫られていることである。もうひとつは、多様な疾患の発症と関連するリソソームの形成と配置の制御機構についての理解が不足していることである。リソソームの動態制御には主に Rab7 と Rab34 が関わる。この2つについては、双方に結合するエフェクター分子の報告などの先行研究があるが、lysosome organizers としての Rab7 と Rab34 の違いはどこにあるかという重要な疑問点がほとんど解明されていない。申請者は、この2つの問題の中心部分は、キーとなる3つの Rab 分子の細胞内での活性動態が不明であることだと考え、活性を可視化する新規 FRET センサーの開発と、正確な解析を可能にする適切な系の選択により、この問題を解決するという着想に至った。

### 2. 研究の目的

後期エンドソーム・リソソーム経路における Rab 分子の役割について、現在2つの大きな問題が存在する。ひとつは初期エンドソームから後期エンドソームへの移行の中心過程である Rab スイッチ機構について基本的な見直しを迫られていることである。もうひとつはリソソームの形成・細胞内配置を制御するキー分子である Rab7 と Rab34 の正確な機能がよくわかっていないことである。本研究では、新たに Rab7 と Rab34 のバイオセンサーを作製し、それを用いて小胞輸送の FRET イメージングに最適な3つの系を解析することで、上記の問題を解明する。これにより、小胞輸送制御の包括的理解の進展と、リソソーム動態の分子制御の破綻に由来する種々の疾患の発症メカニズムを解明する重要な手掛かりを得ることが期待できる。

### 3. 研究の方法

Rab7, Rab34 の活性をモニターする FRET センサーを開発する。EGF 刺激した COS7 細胞におけるマクロピノサイトーシスの過程で、Rab5, Rab7 の活性変化を Rab5, Rab7 の小胞への局在変化と同時に可視化する。そのデータを使って Rab スイッチ機構を担う Rab7 の GEF を同定し、スイッチング時にその GEF を呼び込む未知の機構を解明する。網羅的プロテオミクス解析により Rab7 と Rab34 結合蛋白質の特異的エフェクターを探索する。アポトーシスした胸腺細胞が貪食される系と

胎仔 VE 細胞の構成的エンドサイトーシスの系で、FRET イメージングにより Rab7 と Rab34 の活性変化を可視化する。さらに、Rab7/Rab34 の活性変化と共にそれらとの結合が変化するエフェクター分子を同定することで、リソソームの動態制御における Rab7 と Rab34 の正確な機能を解明する。

### 4. 研究成果

細胞の生存や機能の維持に不可欠な膜輸送経路において、リソソームはエンドサイトーシス、オートファジー、貪食、分泌の各経路から生体高分子や細胞内小器官などを受け取って分解する役割を持つ。そのリソソームの動態を制御するキー分子が Rab7 サブファミリーである。そこで、生きた細胞で活性変化を可視化できる FRET センサーを活用して、Rab7 サブファミリーによる神経細胞での後期エンドソームとリソソーム動態 (形成と細胞内配置) の制御とその破綻の解析を行うことを目指して研究を進めた。センサーのデザインの開発などを積み重ねて、Rab7 の FRET センサーを開発した。複数の手法でこのセンサーが Rab7 の活性をモニターできることを確認しており、またこのセンサーは Rab7 と同じ細胞内局在を示す。さらに EGF 刺激した COS7 細胞を用いて、マクロピノサイトーシスにおける Rab5 と Rab7 の局在と活性の時空間変化の検討を行った。その検討により以下の結果が得られた: Rab5 と Rab7 はマクロピノソームの形成の直前にその場所にリクルートされる。ただし、Rab5 の局在が 10-20 分程度と一過性であるのに対して、マクロピノソームでの Rab7 量は徐々に増大し、30 分程度でプラトーに達したのちもそのレベルを維持し続ける。Rab7 は不活性型でマクロピノソームにリクルートされ、その後 10-30 分程度たってから活性が上がってくる。マクロピノサイトーシスにおいては、Rab5 の局所活性 (より正確には GEF/GAP のバランス) と Rab5 のリクルートがずれている。次に、後期エンドソームとリソソーム動態の制御を解析することを目指して Rab7 センサーを使って、その活性動態を検討した。定常状態の共焦点顕微鏡による断層 FRET 画像から小胞ごとの Rab7 活性に有意なばらつきがあることがわかった。このことは GDP 型の Rab7 が小胞膜上に相当数存在することを示唆する。そのことは、マクロピノサイトーシス過程のイメージングにより Rab7 が小胞膜にリクルートされた後、活性が上がることが観察されたことで裏付けられた。この Rab7 センサーと RNAi 法や種々のマーカーを組み合わせた実験により、分解経路における Rab7 活性の分布と時間変化について複数の新たな知見を得て、それに基づき、分解経路での Rab7 活性の制御と機能的意味について次の仮説を得た: 「後期エンドソームでは Rab7 は Mon1/Ccz1 により活性化され、活性型 Rab7 は後期エンドソームとリソソームの融合に働

く。リソソームでの Rab7 活性化は Mon1/Ccz1 を介さずに起こり、リソソームの核周辺への集積に働く。この知見により、リソソームに特異的な未知の Rab7 活性制御機構の存在が示唆される。Rab34 の FRET センサーの構築は現在進行中で、いくつかの候補が得られている。

#### 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4件)

Lemmon VP, Ferguson AR, Popovich PG, Xu X, Snow DM, Igarashi M, Beatle CE, and Bixby JL. Minimum information about a spinal cord injury experiment: a proposed reporting standard for spinal cord injury experiments. *J. Neurotrauma* 31, 1354-1361. 2014 doi: 10.1089/neu.2014.3400 (査読有) The MIASCI consortium のメンバーとして参加

Nakamura, T., Yasuda, S., Nagai, H., Koinuma, S., Morishita, S., Goto, A., Kinashi, T., and Wada, N. Longest neurite-specific activation of Rap1B in hippocampal neurons contributes to polarity formation through RalA and Nore1A in addition to PI3-kinase. *Genes Cells* 18, 1020-1031. 2013 doi:10.1111/gtc/12097 (査読有)

Fujita, A., Koinuma, S., Yasuda, S., Nagai, H., Kamiguchi, H., Wada, N., and Nakamura, T. GTP hydrolysis of TC10 promotes neurite outgrowth through exocytic fusion of Rab11- and L1-containing vesicles by releasing exocyst component Exo70. *PLoS One*, 8, e79689. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0078689 (査読有)

Nagai, H., Yasuda, S., Ohba, Y., Fukuda, M, and Nakamura, T. All members of the EPI64 subfamily of TBC/RabGAPs also have GAP activities toward Ras. *J. Biochem.* 153, 283-288. 2012 doi: 10.1093/jb/mvs147 (査読有)

##### [学会発表](計16件)

鯉沼真吾、藤田明音、安田さや香、和田直之、中村岳史: cAMP による神経突起伸展における Rho ファミリー分子 TC10 の役割と活性変化、第 37 回分子生物学会年会、横浜パシフィコ、横浜、2014.11.25 (11.25-11.27) (ポスター)

Hiroyuki Nagai, Nanako Ishido, Sayaka Yasuda, Hotaka Kobayashi, Mitsunori Fukuda, Takeshi Nakamura: Analysis of spatial change and temporal

distribution of Rab35 activity during neurite outgrowth. 第 37 回日本神経科学大会、横浜パシフィコ、横浜、2014.9.13 (9.11-9.13) (Poster)

永井寛之、石堂奈々子、安田さや香、小林穂高、福田光則、中村岳史: 神経突起伸展過程における Rab35 の時空間的活性変化の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸、2013.12.3 (ポスター)

藤田明音、鯉沼真吾、安田さや香、永井寛之、上口裕之、和田直之、中村岳史: Rho ファミリー G 蛋白質のひとつである TC10 の GTP 加水分解は、Rab11 と L1 を含む小胞のエキソサイトーシスを介して神経突起伸展を促進する、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸、2013.12.4 (ポスター)

安田さや香、大西悠希、藤田明音、川崎司人、和田直之、和栗聡、Giampietro Schiavo、福田光則、中村岳史: エンドソーム成熟とオートファジーに関わる Rab7 の活性可視化、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸、2013.12.4 (ポスター)

中村岳史、藤田明音、鯉沼真吾、安田さや香、永井寛之、上口裕之、和田直之: Rho ファミリー G 蛋白質 TC10 は細胞膜近くで GDP 型に変わって Exo70 と脱離することにより、小胞のエキソサイトーシスを促進し神経突起伸展に働く、第 22 回バイオイメージング学会学術集会、東京大学薬学部、東京、2013.9.16 (ポスター)

安田さや香、永井寛之、大場雄介、福田光則、中村岳史: TBC/RabGAP の EPI64 サブファミリーの全てのメンバーは Ras に対する GAP 活性を有する、第 22 回バイオイメージング学会学術集会、東京大学薬学部、東京、2013.9.16 (ポスター)

作村諭一、田中大河、池田和司、中村岳史: Rho ファミリー G 蛋白質による細胞形態形成の定量数理モデル、第 36 回日本神経科学大会、京都国際会議場、京都、2013.6.22 (ポスター)

鯉沼真吾、藤田明音、安田さや香、永井寛之、上口裕之、和田直之、中村岳史: Rho ファミリー G 蛋白質 TC10 は細胞膜近傍での GTP 加水分解により小胞の細胞膜融合と突起伸展を促進する、第 36 回日本神経科学大会、京都国際会議場、京都、2013.6.21 (ポスター)

Fujita, A., Koinuma, S., Yasuda, S, Nagai, H., Wada, N., Nakamura, T. A role of the Rac1-TC10 axis in neurite outgrowth, 2012 ASCB annual meeting, The Moscone Center, San Francisco, USA 2012.12.12 (poster)

安田さや香、川崎司人、大西悠希、中村岳史: マクロピノサイトーシスにおける Rab5 の活性制御の解析。第 35 回日本分

子生物学会年会、福岡国際会議場、福岡、  
22012.12.12 (ポスター)

10. 石堂奈々子、永井寛之、小林穂高、  
新井孝夫、服部成介、松田道行、福田光  
則、中村岳史：神経突起伸展における  
Rab35 の活性変化と小胞動態の解析、第  
35 回日本分子生物学会年会、福岡国際  
会議場、福岡、2012.12.12 (ポスター)

Ishido, N., Nagai, H., Kobayashi, H.,  
Arai, T., Fukuda, M., and Nakamura, T.  
Analysis of Rab35 function in neurite  
outgrowth using FRET biosensors,  
SfN2012, Ernest N. Morial Convention  
Center, New Orleans, USA 2012.10.14  
(poster)

Fujita, A., Koinuma, S., Nagai, H.,  
Yasuda, S., Wada, N., and Nakamura, T.  
The Rho family GTPase TC10 is  
implicated in neurite outgrowth  
through membrane addition. 第 56 回神  
経化学会大会、神戸ポートアイランド、  
神戸、2012.9.30 (ポスター)

永井寛之、石堂奈々子、小林穂高、新井  
孝夫、服部成介、松田道行、福田光則、  
中村岳史：FRET センサーを使った神経  
突起伸展における Rab35 の機能解析。第  
35 回日本神経科学大会、名古屋国際会議  
場、名古屋、2012.9.19 (ポスター)

大西悠希、川崎司人 安田さや香、新井孝  
夫、中村岳史：マクロピノサイトーシス  
における Rab5 の活性制御の解析。日本  
バイオイメーキング学会第 21 回大会、京  
都国際会館、京都、2012.8.27(ポスター)

〔図書〕(計 2 件)

1. 中村岳史、七尾友久 エクソサイトーシ  
ス、生体の科学「細胞シグナル操作法」  
66巻5号 (2015) 印刷中
2. 安田さや香、中村岳史 化学とゲノム医  
学、化学と教育 61巻3号 116-119頁(総  
ページ数252頁) (2013).

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsnlab/  
index.html](http://www.rs.noda.tus.ac.jp/~ribsnlab/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 岳史 (NAKAMURA, Takeshi)

東京理科大学・生命医科学研究所・教授

研究者番号：60362604