

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870119

研究課題名(和文)受精における表層顆粒分泌に働く低分子量GTPase RAB-11の分子機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the molecular mechanism for small GTPase RAB-11

## 研究代表者

坂口 愛沙(SAKAGUCHI, Aisa)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90608697

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精は発生の出発点であり，その前後では細胞内外で劇的な物理的・化学的变化が起こる．我々は，低分子量GTPase RAB-11が，線虫において様々な膜輸送システムに関与し，受精に連動して局在や機能を変化させるメカニズムを解明するため，RAB-11の新規結合因子としてREI-1を同定し，機能を解析した．その結果，REI-1がRAB-11の活性化因子として働くこと，初期胚においてRAB-11の局在と機能を制御することを明らかにした．REI-1の分子機能は，ヒトのホモログにおいても保存されていたことから，種をこえて多様な生命機能を担うRab11の時空間的制御機構の解明につながると期待される．

研究成果の概要(英文)：Fertilization triggers a dynamic conversion of intracellular components. We have found that small GTPase RAB-11 changes its localization and function dynamically during oocyte-to-embryo transition in *C. elegans*. In this study, we identified RAB-eleven-interacting protein-1 (REI-1) as a novel guanine nucleotide exchange factor (GEF) for RAB-11. REI-1 family proteins are conserved among metazoan, and its human homolog, SH3BP5 also exhibits a GEF activity toward Rab11. In *C. elegans*, REI-1 is expressed in the germline and co-localizes with RAB-11 on the Golgi membranes. The loss of REI-1 impaired the targeting of RAB-11 to the Golgi compartment and the cleavage furrow in early embryos, which resulted in cytokinesis delay. We suggest that REI-1 is a GEF specifically regulating the RAB-11 localization and functions in early embryos. More extensive studies of the REI-1 family proteins would uncover precise molecular mechanisms of the tissue-specific and spatiotemporal regulation for Rab11.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低分子量GTPase 受精 線虫 Rab11 膜輸送 初期胚

## 1. 研究開始当初の背景

受精は発生の出発点であり、減数分裂期から体細胞分裂期に向けた細胞内外のダイナミックな変化を伴う。これらの受精前後に起こる細胞の物理的・化学的变化においては、細胞内膜輸送システムとそれを司る Rab ファミリータンパク質が重要な役割を担っている。

Rab/Ypt 低分子量 GTPase ファミリータンパク質は、酵母から哺乳動物まで高度に保存されており、膜輸送、オルガネラの動態、細胞質分裂などにおいて多様な機能をもつ。ヒトには 60 種類以上の Rab が存在し、このうち Rab11 は、細胞膜とエンドソームとの間の膜タンパク質のリサイクリング、および分泌、細胞の移動、細胞分裂など、生命にとって不可欠な役割を担う。Rab は GEF (guanine nucleotide exchange factor, グアニンヌクレオチド交換因子) により GDP (グアノシン二リン酸) 結合型から GTP (グアノシン三リン酸) 結合型へと変換されることにより、さまざまなエフェクタータンパク質を介して活性を示す。これまで、数種類の Rab に対する GEF が明らかにされているが、そのアミノ酸配列や分子構造には多様性があり、さらに Rab11 に特異的にはたらく GEF は同定されていないかった。

## 2. 研究の目的

低分子量 GTPase Rab11 は、細胞における局在をダイナミックに変化させながら、膜タンパク質のエンドソームからのリサイクリングおよび分泌、細胞質分裂など、多様な生理機能を制御する。これまでに当研究室 (群馬大学生体調節研究所細胞構造分野) では、線虫の Rab11 ホモログである RAB-11 が、受精前後の各ステップに連動して局在や機能を変化させることを見出している。しかし、RAB-11 のダイナミックな局在変化や多様な機能がどのように制御されているかについては不明な点が多い。本研究では、特に RAB-11 の局在や活性の変化に注目して RAB-11 の制御に関与する新規因子を同定し、その解析を通して RAB-11 の時空間的制御機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規 RAB-11 結合因子の探索

RAB-11 は不活性時には GDP 型、活性時には GTP 型となる。よって、RAB-11 の活性を制御する因子は GDP 型 RAB-11 に特異的に結合することが期待できる。そこで、RAB-11 の活性制御因子を同定する目的で、酵母 two-hybrid スクリーニングを行い、GDP 型 RAB-11 結合因子を探索する。

### (2) 新規 RAB-11 結合因子の生化学的解析

GDP 型 RAB-11 の新規結合因子は、RAB-11 の活性を制御することが期待される。よって、新規因子の RAB-11 活性に対する影響を調べる。RAB-11 の活性は in vitro 系を用いて GDP-GTP 変換効率を測定する。また、哺乳動物においても Rab11 と新規因子のホモログの結合パターンや機能が保存されているか、動物細胞や in vitro の系を用いて検証する。

### (3) 新規 RAB-11 結合因子の線虫における発現と局在の解析

RAB-11 の新規結合因子は、線虫において RAB-11 と同様に生殖腺に発現し、RAB-11 と共局在することが期待される。そこで、蛍光標識した新規タンパク質を線虫に発現させて検証する。

### (4) 新規 RAB-11 結合因子の線虫における機能の解析

新規 RAB-11 結合因子の機能、RAB-11 との関与を調べるため、変異体を用いて解析する。埼玉大学・安藤恵子准教授との共同研究により変異体ライブラリースクリーニングを行い、変異体を得る。RAB-11 結合因子の変異体は、RAB-11 の局在異常を示す可能性があるため、蛍光標識した RAB-11 タンパク質を用いて検証する。観察には共焦点スキャノユニットなどを用い、受精前後のダイナミックな細胞の変化に連動した局在変化に注目する。さらに、RAB-11 結合因子がいつ、どのように RAB-11 の局在や機能に関与するか、様々な遺伝子の変異体を用いて遺伝学的に解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 新規 RAB-11 結合因子 REI-1 の同定

ヒト Rab11a の線虫ホモログ RAB-11.1 は、生殖腺において、受精前後の各ステップに連動してダイナミックに局在や機能を変化させる。まず、RAB-11.1 の局在や機能を制御するタンパク質を同定するため、GDP 結合変異型の RAB-11.1(S25N) と結合するタンパク質を酵母 two-hybrid 法により探索した。その結果、RAB-11.1 と結合する新規のタンパク質として RAB-eleven-interacting protein-1 (REI-1) およびそのホモログである REI-2 を同定した。本スクリーニングによる REI-1 と REI-2 の同定は、当研究室の佐藤美由紀助教 (現: 群馬大学生体調節研究所生体膜機能分野・准教授) が行った。

REI-1 はタンパク質ファミリーを形成しており、ヒトを含む哺乳動物やショウジョウバエにおいても保存されていた。REI-2 およびヒトにおけるホモログである SH3BP5 は、長

いヘリックス構造を形成する F-BAR ドメインあるいは BAR ドメインをもち、REI-1 にもこれらのドメインに類似したヘリックス構造が存在することがわかった。F-BAR ドメインおよび BAR ドメインは、タンパク質の二量体化、脂質との結合、膜の曲率の感知などに機能することが示唆されている。そこで、REI-1 および REI-2 が二量体を形成する可能性について検討した。酵母 two-hybrid 法により結合のパターンを解析した結果、REI-1 と REI-2 とは結合しないが、REI-1 同士、および、REI-2 同士は結合することがわかった。そこで、ゲルろ過クロマトグラフィーにより組換え REI-1 タンパク質の分子量を調べたところ、二量体、四量体、および、多量体を形成したときの分子量に対応する位置にシグナルが検出された。これらの結果から、REI-1 はホモ二量体もしくは多量体を形成すると考えられた。

#### (2) RAB-11 に対する GEF 活性の解析

REI-1 は、GTP 結合型の RAB-11.1(Q70L)よりも GDP 結合型の RAB-11.1(S25N) および、GTP と GDP とともに結合しない変異型 RAB-11.1(N124I)と強く結合し、これは既知の Rab-GEF と Rab との結合パターンと同様であった。そこで、蛍光標識した GDP アナログと生体膜を模したリポソームを用いた *in vitro* GEF アッセイにより、RAB-11.1 からの GDP の放出効率を測定した。その結果、REI-1 は RAB-11.1 に対し強い GEF 活性を示すことがわかった。この REI-1 の RAB-11.1 に対する GEF 活性はリポソームの有無に依存しており、膜構造の重要性が示唆された。そこで、REI-1 が膜に直接的に結合する可能性についてショ糖勾配フローテーションアッセイにより調べた結果、REI-1 はリポソームと直接的に結合する能力をもつことがわかった。また、REI-1 ファミリータンパク質が F-BAR ドメインや BAR ドメインに類似したヘリックス構造をもつことから、REI-1 の活性が膜の曲率に依存するかどうかについて調べた。しかし、大きさの異なるリポソームを用いても違いがみられなかったことから、少なくとも *in vitro* GEF アッセイからは、膜の曲率は REI-1 の GEF 活性に影響しないと考えられた。

次に、REI-1 の分子機能が種をこえて保存されているか調べた。ヒトにおけるホモログである SH3BP5 は Sab とよばれ、無ガンマグロブリン血症において変異の報告がされている Btk の SH3 ドメインと結合するタンパク質として発見された。SH3BP5 とヒト Rab11 を用いて、REI-1 の機能が哺乳動物においても保存されているかどうか調べた結果、SH3BP5 も GDP 結合型、および、GTP と GDP とともに結合していない Rab11 と強く結合することがわかった。また、SH3BP5 はリポソームの非存在下においても Rab11 に対し GEF 活性を示し、リポソームを加えることによりその活

性は増強した。線虫の REI-1 もヒトの Rab11 に対し強い GEF 活性を示したことから、REI-1 の GEF としての機能は種をこえて保存されていると考えられた。

#### (3) REI-1 の発現と局在の解析

REI-1 の発現および細胞内局在について調べるため、線虫において GFP と REI-1 との融合タンパク質を *rei-1* 遺伝子のプロモーターの制御下で発現させたところ、主に生殖腺において発現がみられた。GFP-REI-1 融合タンパク質は、卵母細胞においてはドット状のゴルジ体や表層顆粒に局在し、一部は RAB-11.1 と共局在した。初期胚においては、主にドット状の局在を示し、後期ゴルジ体のマーカーである SYN-16 と共局在した。また、REI-1 および SYN-16 のシグナルは RAB-11.1 とも共局在したことから、REI-1 は後期ゴルジ体において RAB-11.1 と共局在していると考えられた。ただし、RAB-11.1 のシグナルは REI-1 および SYN-16 よりも広い範囲にみられたことから、一部の RAB-11.1 は輸送小胞あるいはリサイクリングエンドソームなどゴルジ体より先方のコンパートメントに局在していると考えられた。

#### (4) 変異体を用いた REI-1 の機能の解析

線虫における REI-1 ファミリータンパク質の機能を調べるため、REI-1 とそのホモログである REI-2 の遺伝子欠失変異体を作製した。*rei-1* 変異体および *rei-2* 変異体は野生型と同様の生育および産仔数を示したが、*rei-1*; *rei-2* 二重変異体においては産仔数が 3 割ほど減少した。

次に、RAB-11.1 の局在に対する *rei-1*; *rei-2* 変異の影響について調べた。野生型における RAB-11.1 は、卵母細胞においては主にリサイクリングエンドソームおよびゴルジ体に局在し、卵黄タンパク質受容体のリサイクリングを制御し栄養分の取り込みに寄与している。受精の直前になると、細胞外マトリックス成分を含有する表層顆粒へ移動し、受精直後の表層顆粒の分泌を制御する。初期胚においては、RAB-11.1 はリサイクリングエンドソームおよびゴルジ体に再局在し、細胞分裂時には分裂溝に集積して細胞質分裂を制御する。GFP-RAB-11.1 融合タンパク質を発現する線虫を用いて調べた結果、*rei-1* 変異体では、卵母細胞における RAB-11.1 の局在や機能には大きな影響が見られなかったが、初期胚においては RAB-11.1 のドット状の局在が大幅に減少した。このとき、胚全体における GFP-RAB-11.1 のシグナルの強さおよび発現量に変化はなかったことから、*rei-1* 変異体においては、RAB-11.1 のゴルジ体やリサイクリングエンドソームへの局在化が阻害されていると考えられた。このような RAB-11.1 の局在異常は、*rei-2* 変異体では

ほとんどみられなかったが, *rei-1; rei-2* 二重変異体では *rei-1* 変異体より増強していた。また, ゴルジ体などのオルガネラの形成や分布に対する影響を調べるため, 後期ゴルジ体のマーカーである SYN-16 および初期エンドソームのマーカーである RAB-5 の分布についても確認したが, *rei-1* 変異体および *rei-2* 変異体において異常はみられなかった。これらのことから, REI-1, REI-2 は主に初期胚において RAB-11.1 の局在を特異的に制御すると考えられた。

#### (5) 細胞分裂時の RAB-11 に対する REI-1 の機能の解析

RAB-11.1 は, 線虫の初期胚において, 細胞分裂時には分裂溝に集積し細胞質分裂にはたらくことが知られており, この局在変化や機能は哺乳動物細胞においても報告されている。そこで, *rei-1* 変異体および *rei-2* 変異体において細胞分裂時の RAB-11.1 の局在について調べた。その結果, *rei-1* 変異体では細胞質分裂の際に細胞膜の陥入は起こるが, RAB-11.1 がドット状や分裂溝に局在せず, 細胞質分裂の遅延がみられた。細胞質分裂時の RAB-11.1 の局在の異常および細胞質分裂の遅延は, *rei-2* 変異体ではほとんどみられなかったが, *rei-1; rei-2* 二重変異体では増強していた。これらの結果から, REI-1 ファミリータンパク質は初期胚の細胞分裂において RAB-11.1 の局在を制御し, 適切な細胞質分裂に寄与していることがわかった。このとき, REI-1 自身も分裂溝に集積して RAB-11.1 の活性を制御する可能性が考えられたが, REI-1 やゴルジ体マーカーである SYN-16 は分裂溝に局在しなかった。これらのことから, RAB-11.1 は後期ゴルジ体において REI-1 によって GTP 結合型へ変換されたのちに, 分裂溝に局在するというモデルが考えられた (図 1)。

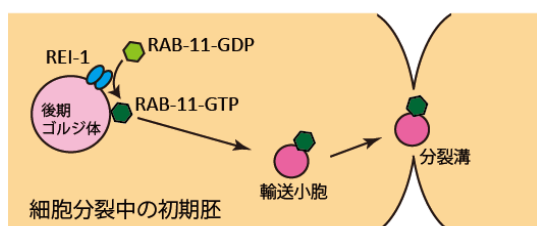


図 1. 線虫初期胚の細胞分裂時の REI-1 による RAB-11.1 の局在および活性の制御モデル

我々は, この研究において, RAB-11 に対する新規の GEF として REI-1 を同定した。REI-1 ファミリータンパク質は既知の Rab-GEF ドメインをもたない新しいタイプの GEF であった。興味深いことに, REI-1 ファミリータンパク質は二量体化や脂質結合などに関与する F-BAR ドメインおよび BAR ドメインをもつ。REI-1 は既知の BAR ドメインタンパク質と同

様に, ホモ二量体を形成して膜に直接的に結合する能力をもっていたことから, これらのドメインは REI-1 ファミリータンパク質の特異的な膜への局在を介し, Rab11 活性化の空間的な制御に寄与しているのかもしれない。さらに, REI-1 ファミリータンパク質はリポソームの存在下で GEF 活性が増強したことから, 膜への結合が GEF 活性を制御する可能性も考えられた。REI-1 ファミリータンパク質のさらなる解析は, Rab11 の機能を時空間的に制御する分子機構の理解につながると期待される。

#### <引用文献>

Grant, B., Hirsh, D.: Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol. Biol. Cell*, 10, 4311-4326 (1999)

Sato, M., Grant, B. D., Harada, A. et al.: Rab11 is required for synchronous secretion of chondroitin proteoglycans after fertilization in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.*, 121, 3177-3186 (2008)

Skop, A. R., Bergmann, D., Mohler, W. A. et al.: Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex. *Curr. Biol.*, 11, 735-746 (2001)

Matsushita, M., Yamadori, T., Kato, S. et al.: Identification and characterization of a novel SH3-domain binding protein, Sab, which preferentially associates with Bruton's tyrosine kinase (Btk). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 337-343 (1998)

#### 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)

Ken Sato, Aisa Sakaguchi, Miyuki Sato (2016). REI/SH3BP5 protein family: New GEFs for Rab11. *Cell Cycle* 15, 767-769, 査読無

DOI: 10.1080/15384101.2015.1137710

坂口 愛沙, 佐藤 美由紀, 佐藤 健 (2015) REI-1 は線虫の初期胚において RAB-11 の局在および機能を制御する GEF である。ライフサイエンス新着論文レビュー, 査読無

DOI: 10.7875/first.author.2015.131

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/11913>

Aisa Sakaguchi, Miyuki Sato, Katsuya Sato, Keiko Gengyo-Ando, Tomohiro Yorimitsu, Junichi Nakai, Taichi Hara, Ken

Sato, Ken Sato (2015). REI-1 Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor Regulating RAB-11 Localization and Function in *C. elegans* Embryos. *Developmental Cell* 35, 211 - 221, 査読有  
DOI: 10.1016/j.devcel.2015.09.013.

〔学会発表〕(計 4 件)

坂口 愛沙, 佐藤 美由紀, 安藤 恵子, 佐藤 克哉, 中井 淳一, 佐藤 健. 低分子量 GTPase RAB-11 の新規結合因子 REI-1/REI-2 は受精後の RAB-11 再局在化を制御する. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Aisa Sakaguchi, Miyuki Sato, Keiko Gengyo-Ando, Katsuya Sato, Junichi Nakai, Ken Sato. Novel binding partner of small GTPase RAB-11 regulates RAB-11 redistribution to Golgi after fertilization.

*C. elegans* Development, Cell Biology, Gene Expression Meeting in association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 2014 年 7 月 18 日, 奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

坂口 愛沙, 佐藤 美由紀, 安藤 恵子, 佐藤 克哉, 中井 淳一, 佐藤 健. 線虫受精卵においてダイナミックに変化する RAB-11 の動態制御機構の解析. 第 66 回日本細胞生物学会大会, 2014 年 6 月 12 日, 奈良県新公会堂・東大寺総合文化センター (奈良県奈良市)

〔その他〕

群馬大学・生体調節研究所・細胞構造分野ホームページ

<http://traffic.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.html>

本研究成果は, 読売新聞, 上毛新聞 (2015 年 10 月 29 日), 毎日新聞 (2015 年 11 月 13 日) に掲載された.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂口 愛沙 (SAKAGUCHI, Aisa)

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号: 90608697