

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291038

研究課題名(和文) ARLファミリーGタンパク質群の作動原理と生理機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of activation mechanism and physiological function of ARL family small GTPases

研究代表者

紺谷 圏二 (Kontani, Kenji)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30302615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は本研究において、ARLファミリー低分子量Gタンパク質ARL8bが、マウス胚の正常な生育及び脳形成に必要であることを明らかにした。ARL8bは、卵黄嚢内胚葉に取り込まれた母体由来タンパク質のリソソーム分解に重要であり、卵黄嚢内胚葉におけるARL8bの機能欠損は、胎仔におけるアミノ酸量の減少と生育不全を引き起こすことを明らかにした。また胚発生時の脳形成において、ARL8bがBMPシグナリングの制御に関わっている可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified that the ARL family small GTPase ARL8b is necessary for normal growth and brain development of mouse embryos. ARL8b was found to be important for lysosomal degradation of maternally derived protein components incorporated in the visceral yolk sac endoderm, and the functional deficiency of ARL8b in the visceral yolk sac endoderm caused a reduction in the amount of amino acids in the embryo proper and a failure of embryonic growth. We also found that ARL8b may be involved in the regulation of BMP signaling in embryonic brain development.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：低分子量Gタンパク質 リソソーム エンドサイトーシス 一次繊毛 マウス 胚発生 卵黄嚢内胚葉

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G タンパク質ファミリーは、Ras、Rho/Rac、Rab、Arf/Arl、Ran といったサブファミリーからなり、GDP 結合型と GTP 結合型の二つの異なる構造の変換(G サイクル)を介して、シグナル伝達系、膜輸送系、細胞骨格系などの制御において重要な“分子スイッチ”として機能することが知られている。しかし近年、生化学的性状あるいは一次構造の観点から、既存の低分子量 G タンパク質ファミリーとは異なる“アтипカル”な機能未知の低分子量 G タンパク質群が多数存在することが明らかとなり、G タンパク質の活性調節機構と生理機能は新たな展開を見せようとしている。申請者はこれまでに ARL ファミリー低分子量 G タンパク質群に属するいくつかの分子がそのようなアтипカルな性状を示すことを明らかにしてきたが、それらの活性調節の要である G サイクルの制御メカニズムや、個体レベルでの生理的役割に関しては未解明であった。これらの研究背景から申請者は、多角的な研究手法による“ARL ファミリーG タンパク質群の作動原理と生理機能の解析”という本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 酸性オルガネラの機能と低分子量 G タンパク質 ARL8

リソソームは、後期エンドソーム・ファゴソーム・オートファゴソームといった膜オルガネラと直接融合し、物質分解に重要な役割を果たすことが良く知られているが、この融合の分子メカニズムに関しては未解明な点が多い。申請者らはこれまでに、ARL8 がリソソームと後期エンドソーム及びファゴソームとの融合を正に制御することを明らかにしてきた (Sasaki, *MBC*, 2013; Nakae, *MBC*, 2010)。ARL8 は、数十種類存在する低分子量 G タンパク質群のなかで唯一、主にリソソームに局在する G タンパク質であるが、申請者らは ARL8 がリソソームのみならずシナプス小胞の機能動態にも重要であることを見いだしている (Klassen, *Neuron*, 2010)。さらに、各種膜オルガネラに関するプロテオミクス解析から、ARL8 はリソソームやシナプス小胞以外の種々の酸性オルガネラにも存在することが示されており、GTP 結合型で待機する ARL8 が、酸性オルガネラ全般において、何らかの普遍的に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。本研究では、代表的な酸性オルガネラであるリソソームにおける、ARL8 の生理的役割の解明を目的とする。

(2) 一次繊毛の形成・機能に介在する ARL ファミリー低分子量 G タンパク質の解析 細胞膜から突出した細胞小器官である非運

動性繊毛(一次繊毛)は、脊椎動物の殆どの細胞に存在するが、その機能は長らく不明であり、これまでは“無用の長物”と考えられてきた。しかし近年、一次繊毛の形成・機能異常が、嚢胞腎、Bardet-Biedl 症候群、Joubert 症候群などの疾患の原因であることが明らかとなり、その生理機能が一躍脚光を浴びるようになった。マルチ機能ドメイン G タンパク質 ARL13b は Joubert 症候群の原因遺伝子であるが、申請者らはこれまでに、培養細胞及び線虫を用いた解析から、ARL13b が、一次繊毛の形成や繊毛内物質輸送に重要であることを報告してきた (Cevik, *PLoS Gen*, 2013; Cevik, *JCB*, 2010; Kontani, *Nature Mol. Pages*, 2009)。また Bardet-Biedl 症候群の原因遺伝子である ARL6 に関しては、疾患で同定されたミスセンス変異が、ARL6 の生化学特性に与える影響を明らかにしてきた (Kobayashi, *BBRC*, 2008)。そこで本研究では、ARL13b や ARL6 の作動原理や機能的役割に関する解析を行い、それらの遺伝子変異が原因となって発症する疾患の分子の基盤の理解に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 各種の遺伝子改変マウスの作出

ARL8b ジーントラップ ES 細胞を MMRRRC より購入し、ARL8b ジーントラップマウス(以下、ARL8b ノックアウトマウスと表記)を作製した。また、ARL8b^{lox/lox}マウス(東京大学医学研究所・三宅健介博士から分与)と *Ttr-Cre* トランスジェニックマウス(Anna-Katerina Hadjantonakis 博士から分与)との交配により、卵黄嚢内胚葉(VYSE: visceral yolk sac endoderm) 特異的 ARL8b 欠損マウスの作製を行った。マウス胚の切片作製及び各種染色等は定法に従って行った。

(2) マウス胚のメタボローム解析

マウス胚(E9.5)の胚本体及び卵黄嚢内胚葉について、LC-MS/MS 及び IC-MS によりメタボローム解析を行った(慶應義塾大学医学部・杉浦悠毅博士との共同研究)。

(3) 細胞内における低分子量 G タンパク質のヌクレオチド結合状態の解析

各種の ARL ファミリー低分子量 G タンパク質を発現する培養細胞を、放射標識された無機リン酸を含む培地で培養することにより、細胞内のグアニンヌクレオチドを代謝ラベルした後、発現させた低分子量 G タンパク質を免疫沈降した。その画分を TLC により展開し、低分子量 G タンパク質に結合していた GDP および GTP の量を解析した。

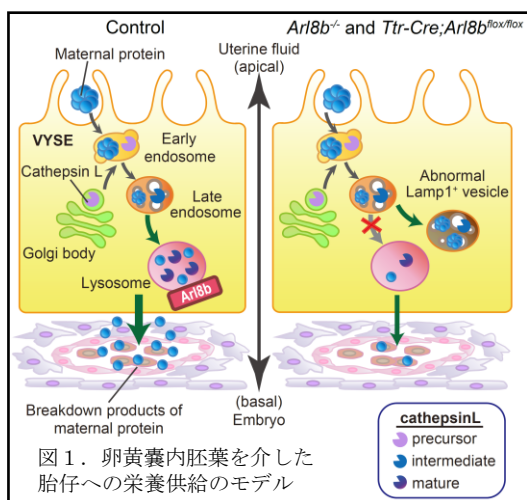
4. 研究成果

(1) マウス胚発生における ARL8b の生理

役割の解析

哺乳動物では非常に相同性の高い 2 つの ARL8 (ARL8a と ARL8b) が存在するが、本研究で申請者は ARL8b 欠損マウスの表現型解析を行い、以下に記すように ARL8b が正常な胚発生に重要であることを明らかにした。

ジーントラップ法により作出した ARL8b ホモ欠損マウスの胎仔は、体長の縮小・脳形成不全といった発生異常を示した。ARL8b ホモ欠損マウスでは、胎仔を包む膜状の卵黄嚢内胚葉 (VYSE) が肥大化しており、細胞内には後期エンドソーム・リソソームと考えられるオルガネラの蓄積が観察された。VYSE はエンドサイトーシスで取り込んだ母体由来物質をリソソームで分解し、胎仔へ栄養供給することが知られているが、ARL8b ホモ欠損マウスの VYSE では母体由来タンパク質の蓄積が観察され、VYSE 特異的 ARL8b 欠損マウスでもこれらの表現型が観察された。さらにメタボローム解析から、VYSE 特異的 ARL8b 欠損マウスの胎仔本体において、必須アミノ酸を含む複数のアミノ酸量が低下していることが明らかとなった。従って ARL8b が欠損すると VYSE からの胎仔への栄養供給が低下して、胚発生の異常 (体長の縮小) を生じる可能性が考えられた。以上の知見は、*J Cell Sci* 誌に発表した (図 1)。



一方、ジーントラップ法により作出した ARL8b ホモ欠損マウスで観察された脳形成不全の表現型は、VYSE 特異的 ARL8b 欠損マウスでは観察されなかった。従って、胎仔本体での ARL8b の発現も、正常な胚発生に必要であることが示唆された。胚発生中期では、ARL8b ホモ欠損マウスは、脳背側正中線に特徴的な遺伝子発現の異常を示した。脳背側正中線を構成する細胞は、神経管閉鎖前に BMP シグナルによって運命決定される細胞群であるが、ARL8b 欠損マウスでは、この細胞群で BMP シグナルが異常に増強していた。培養細胞を用いた解析では BMP により活性化された BMP 受容体はエンドサイトーシス後にリソソームで分解されることが

示されていることから、ARL8b 欠損マウスでは BMP 受容体の分解不全に伴い BMP シグナルが持続的に活性化し、背側正中線の運命決定に異常を呈する可能性が考えられた。

また ARL8b ホモ欠損マウスを用いた解析に関しては、東京大学医科学研究所・三宅健介博士・齋藤伸一郎博士らとの共同研究から、TLR7 を介した I 型インターフェロン産生に ARL8b が関与することを明らかにした。

(2) ARL6 のグアニンヌクレオチド結合特性の解析

細胞内における ARL6 の GDP/GTP 結合状態を検討するため、一次繊毛を形成する IMCD3 細胞で ARL6-EGFP を発現する細胞株を作成して解析を行った。その結果、細胞内の ARL6-EGFP の大部分は GDP 結合型で存在していることが明らかとなった。次に、一般的に G タンパク質の不活性化過程に必須である加水分解能が欠損すると考えられる点変異 (Q73L) を導入した ARL6 に関して同様の解析を行ったところ、多くの低分子量 G タンパク質とは異なり、野生型と同様に大部分が GDP 結合型であった。従って通常状態の IMCD3 細胞に存在する大部分の ARL6 は、活性化反応 (GDP の解離に伴う GTP の結合反応) を受ける状況下でないことが示唆された。

一般的に ARF/ARL ファミリー分子は、両親媒性の N 末端領域がその活性化を抑制しており、グアニンヌクレオチド交換促進因子などの作用によって活性化される状況下では、その両親媒性の N 末端領域が膜脂質と相互作用することで構造変化が起こり、GDP の解離に伴う GTP 結合型への変換が亢進すると考えられている。そこで、ARL6 の両親媒性の N 末端領域を欠損した変異体を作製して解析したところ、N 末端欠損体では細胞内での GTP 型の割合が大きく上昇することが明らかになった。従って他の ARF/ARL ファミリー分子と同様に、ARL6 もその N 末端領域が適切なオルガネラ膜と相互作用することで構造変化が生じ、GDP-GTP 交換反応が促進される可能性が考えられた。

また ARL13b の機能解析に関しては、京都大学大学院薬学系研究科・中山和久博士らとの共同研究から、一次繊毛内の逆行輸送に ARL13b が関与することを明らかにした

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 9 件)

① Shimizu, H., Toma-Fukai, S., Saijo, S., Shimizu, N., Kontani, K., Katada, T., and Shimizu, T. (2017) Structure-based analysis of the guanine nucleotide exchange factor SmgGDS reveals armadillo-repeat motifs and key regions for activity and GTPase binding. *J Biol Chem*

292, 13441-13448 (査読有)
DOI:10.1074/jbc.M117.792556

②Saitoh, S., Abe, F., Kanno, A., Tanimura, N., Mori-Saito, Y., Fukui, R., Shibata, T., Sato, K., Ichinohe, T., Hayashi, M., Kubota, K., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Kikko, Y., Katada, T., Kontani, K., and Miyake, K. (2017) TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun* **8**, 1592 (査読有)
DOI: 10.1038/s41467-017-01687-x

③Oka, M., Hashimoto, K., Yamaguchi, Y., Saitoh, S. I., Sugiura, Y., Motoi, Y., Honda, K., Kikko, Y., Ohata, S., Suematsu, M., Miura, M., Miyake, K., Katada, T., and Kontani, K. (2017) Arl8b is required for lysosomal degradation of maternal proteins in the visceral yolk sac endoderm of mouse embryos. *J Cell Sci* **130**, 3568-3577 (査読有)
DOI: 10.1242/jcs.200519

④Nozaki, S., Katoh, Y., Terada, M., Michisaka, S., Funabashi, T., Takahashi, S., Kontani, K., and Nakayama, K. (2017) Regulation of ciliary retrograde protein trafficking by the Joubert syndrome proteins ARL13B and INPP5E. *J Cell Sci* **130**, 563-576 (査読有)
DOI: 10.1242/jcs.197004

⑤Nagata, Y., Kontani, K., Enami, T., Kataoka, K., Ishii, R., Totoki, Y., Kataoka, T. R., Hirata, M., Aoki, K., Nakano, K., Kitanaka, A., Sakata-Yanagimoto, M., Egami, S., Shiraiishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Shiozawa, Y., Yoshizato, T., Suzuki, H., Kon, A., Yoshida, K., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Sanada, M., Munakata, W., Nakamura, H., Hama, N., Miyano, S., Nureki, O., Shibata, T., Haga, H., Shimoda, K., Katada, T., Chiba, S., Watanabe, T., and Ogawa, S. (2016) Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **127**, 596-604 (査読有)
DOI: 10.1182/blood-2015-06-644948

⑥Ogita, Y., Egami, S., Ebihara, A., Ueda, N., Katada, T., and Kontani, K. (2015) Di-Ras2 Protein Forms a Complex with SmgGDS Protein in Brain Cytosol in Order to Be in a Low Affinity State for Guanine Nucleotides. *J Biol Chem* **290**, 20245-20256 (査読有)
DOI: 10.1074/jbc.M115.637769

⑦Fukuyama, M., Kontani, K., Katada, T., and Rougvie, A. E. (2015) The *C. elegans* Hypodermis Couples Progenitor Cell Quiescence to the Dietary State. *Curr Biol* **25**, 1241-1248 (査読有)
DOI: 10.1016/j.cub.2015.03.016

⑧Saito, K., Yamashiro, K., Shimazu, N., Tanabe, T., Kontani, K., and Katada, T. (2014) Concentration of Sec12 at ER exit sites via interaction with cTAGE5 is required for collagen export. *J Cell Biol* **206**, 751-762 (査読有)
DOI: 10.1083/jcb.201312062

⑨紺谷 圈二 (2014) Arf-like GTPase による膜オルガネラ動態の制御、生化学、Vol86、98-102 (査読有)
<https://seikagaku.jbsoc.or.jp/>

[学会発表] (計 10 件)

①紺谷 圈二、マウス胚発生における低分子量 G タンパク質 Ar18b の役割 (招待講演)、第 69 回 日本細胞生物学会大会、2017 年、

②荒木信、HMG-CoA 還元酵素阻害薬によるオートファジー誘導機構の解析、第 16 回 生命科学研究会、2017 年

③荒木信、スタチン誘導性オートファジーの分子機構の解析、平成 29 年度 日本生化学会 関東支部例会、2017 年

④荒木信、HPLC を用いた低分子量 G タンパク質のグアニンヌクレオチドフォームの定量的解析、ConBio2017、2017 年

⑤Kontani K, Arl8b is required in the visceral yolk sac endoderm for lysosome degradation of maternal proteins during mouse early embryogenesis, FASEB Science Research Conferences “GTPases in Trafficking, Autophagy and Disease”, 2016 年

⑥橋本圭介、マウス胚発生における低分子量 G タンパク質 Ar18b の機能、第 89 回日本生化学会、2016 年

⑦荒木信、脂質代謝異常症治療薬スタチン依存的な mTORC1 調節機構は GGPP を介し細胞種特異的である、第 89 回日本生化学会、2016 年

⑧岡実穂、マウス初期胚発生過程において低分子量 G タンパク質 Ar18b は母体由来タンパク質のリソソーム分解に必要である、BMB2015、2015 年

⑨橋本圭介、低分子量 G タンパク質 Ar18b はマウス胚発生における正常な脳形成に必要である、BMB2015、2015 年

⑩江上幸子、低分子量 G タンパク質 DiRas2 の SmgGDS による動態調節機構、ファーマイオフォーラム 2014、2014 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/kyoin/kyoin_132.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紺谷 圏二 (Kontani, Kenji)
明治薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：30302615

(2) 研究分担者

荒木 信 (Araki, Makoto)
明治薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20552904
(平成 27 年度から)

福山 征光 (Fukuyama, Masamitsu)
東京大学大学院薬学系研究科・助教
(現・東京大学大学院薬学系研究科・講師)
研究者番号：20422389
(平成 26 年度のみ)

齋藤 康太 (Saito, Kota)
東京大学大学院薬学系研究科・助教
(現・秋田大学大学院医学系研究科・教授)
研究者番号：60549632
(平成 26 年度のみ)

(3) 連携研究者

堅田 利明 (Katada, Toshiaki)
東京大学大学院薬学系研究科・教授
(現・武蔵野大学薬学部・教授)
研究者番号：10088859

(4) 研究協力者

なし