

平成 2 8 年 1 0 月 1 9 日現在

機関番号： 1 4 4 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2014 ~ 2015

課題番号： 2 6 8 4 0 0 3 6

研究課題名 (和文) リサイクリングエンドソーム発Rasシグナル伝達機構の立証

研究課題名 (英文) Demonstration of Ras-signal transduction from recycling endosomes

研究代表者

三崎 亮 (Misaki, Ryo)

大阪大学・生物工学国際交流センター・講師

研究者番号： 2 0 5 7 1 1 8 6

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要 (和文) : Ras活性化因子RasGRP1がリサイクリングエンドソーム (RE) に局在するRasを特異的に活性化することが示唆された。RasGRP1はREでRasと共局在しRasは活性を示したが、REに局在しない変異型Rasと共局在しなかった。不活性型RasGRP1はREでRasと強く共局在せずRasは不活性型であること、内在性RasGRP1の発現抑制下では、REに局在するRasは不活性型であることが分かった。また、RE膜にはホスファチジルセリン (PS) が豊富に存在するが、PS合成酵素1ノックアウト細胞を構築したところ、RE膜のPSがRas局在および活性化に影響を与えないことが分かった。

研究成果の概要 (英文) : In this study, it was suggested that a Ras-activation factor, RasGRP1, activates H-Ras localizing to recycling endosomes (REs). RasGRP1 colocalized with activated-Ras on REs but not with non-palmitoylated mutant Ras lacking the stable REs-localization. Inactivated RasGRP1 did not colocalize with Ras on REs strongly and the Ras was the inactivated form. Ras was also inactivated-form on REs under knockdown of endogenous RasGRP1 expression. Membrane of REs is known to have abundant phosphatidylserine (PS). However, establishment of PS synthase 1-knockout cells resulted in no effect of PS depletion on the Ras-activation and the correct Ras localization. These results mean that activation of Ras on REs requires interaction with RasGRP1 and PS on REs does not affect function of RasGRP1.

研究分野：細胞生物学 糖鎖工学

キーワード：Recycling endosome Ras Signal transduction RasGRP

1. 研究開始当初の背景

リサイクリングエンドソーム (RE) は物質の再回収を担うことで見出されてきた細胞小器官である。ところが、これまで再回収以外の役割については不明であったが、近年では RE で働く分子も発見され徐々にその重要性が明らかになりつつある。その結果、RE が再回収だけではなく複数の輸送経路を制御すること、他の細胞小器官とは異なる膜成分を持つということが分かってきた。例えば、近年では海外研究グループがウイルスタンパク質や免疫細胞サイトカインのエキソサイトーシスに RE が関わることを示し、国内研究者がコレラ毒素の逆行輸送にも RE が機能的に関わることを、特に他の細胞小器官とは異なり、RE の膜成分としてホスファチジルセリン (PS) が豊富に存在すること、PS を介して RE で機能する分子を見出した。

一方、筆者らはシグナル伝達機構で中心的な役割を担い、かつ癌原としても知られる Ras タンパク質 (H および N-Ras) について、主な細胞内局在がこれまでの報告にある「ゴルジ体/細胞膜」ではなく「RE/細胞膜」であること、RE への局在には C 末端領域のパルミトイル脂質修飾が必要であること、ゴルジ体から RE を経由しエキソサイトーシスによって細胞膜に輸送されること、さらに RE に局在する Ras が細胞膜同様に活性状態にあること、を明らかにした。この結果、Ras 介した RE からのシグナル伝達機構が存在するのではないか、という新しい仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

Ras が RE で活性化される機構を調査し、また、RE の特殊な脂質環境が Ras の安定的な局在と活性化に及ぼす影響を検証するため、下記 2 つの目的を掲げた。

(1) RE を介した Ras 活性化機構の解明

筆者らは活性型 Ras が安定的に RE に局在することを見出したものの、その活性化機構については知見がない。そこで、本研究課題では、Ras 活性化因子が RE に局在する Ras を活性化するかどうか、について調査した。活性化因子の機能を阻害することで RE での Ras 活性化を特異的に抑制できれば、細胞膜とは異なったシグナル伝達が RE で起きていることを証明する重要な証拠となり得ると考えた。

(2) RE 脂質環境不全が Ras 活性化に及ぼす影響の調査

先行研究から、他の細胞小器官とは異なり RE が細胞膜同様に PS に富む膜成分を持つこと、PS を介して RE を経由する膜輸送に機能的に関わる分子が存在することが分かった。これまで、細胞膜はシグナル伝達の間として広く研究されてきたが、RE では検証されていない。従って、本研究課題では、RE の豊富な

膜脂質成分である PS が RE での Ras 活性化の足場として必要とされるかどうか、を PS 不全細胞を用いて検証した。細胞小器官の膜脂質環境と Ras を介したシグナル伝達の関係についての知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、実験に使用する細胞として、光学顕微鏡下で RE の観察が容易であるアフリカミドリザル腎臓由来 COS-1 細胞を選抜した。

(1) RE を介した Ras 活性化機構の解明

Ras 活性化因子の中で特に着目する RasGRP1 の局在を観察した。共焦点レーザー顕微鏡下で局在を観察するために、蛍光タンパク質との融合タンパク質として RasGRP1 を発現するベクターを構築した。当該 RasGRP1 と野生型 H-Ras、恒常活性型および恒常不活性型 H-Ras、パルミトイル基脂質付加部位変異型 H-Ras (H-Ras-C181S : H-Ras の 181 番目のシステインをセリンに置換。RE に局在できずゴルジ体に限局する。) をそれぞれ共発現し、RasGRP1 との局在関係について検証した。また、活性型 H-Ras の局在は、シグナル伝達経路下流に位置する Raf タンパク質の活性型 Ras 結合領域 (RBD) の局在を見ることで確認した。

内在性 RasGRP1 の機能を阻害するため、活性部位にアミノ酸変異を導入した不活性型 RasGRP1 発現用ベクターを構築した。不活性型 RasGRP1 と H-Ras を共発現することで H-Ras の活性化がどのような影響を受けるのかを検証した。また、siRNA を利用して内在性 RasGRP1 をノックダウンした細胞を準備し、同様に H-Ras の活性化がどのような影響を受けるのかを検証した。

また、ジアシルグリセロールは RasGRP1 が機能する足場としての役割を果たす。よって、細胞内でジアシルグリセロールおよびカルシウムイオンの濃度を制御する PLC-gamma1 に着目し、当該遺伝子を siRNA を用いてノックダウンした。PLC-gamma1 ノックダウン下での H-Ras 活性化について上記と同様に検証した。

(2) RE 脂質環境不全が Ras 活性化に及ぼす影響の調査

PS 合成不全細胞を準備するために、PS 合成酵素 1 (PSS1) をノックアウトした COS-1 細胞を構築した。CRISPR/CAS9 システムを利用してゲノム上の PSS1 遺伝子を破壊した。塩基配列から遺伝子破壊を確認した細胞を用いて、透析した血清を添加した培地で培養することで PS 枯渇細胞を調製した。PS の検出には、PS を認識 (あるいは相互作用) できるタンパク質を発現することで行った。当該細胞を宿主として H-Ras を発現し、RE 上の PS の減少が H-Ras の局在と活性化に与える影響を検証した。また、ウエスタンブロッティ

ングにより Ras 下流シグナル伝達関連タンパク質のリン酸化について調べた。

4. 研究成果

(1) RE を介した Ras 活性化機構の解明

光学顕微鏡で RE の観察が容易である COS-1 細胞を用いて、タンパク質の局在解析を行った。これまでの研究成果から、Ras 活性化因子 RasGRP1 に着目しており、当該タンパク質を赤色蛍光タンパク質 (RFP) との融合タンパク質 RFP-RasGRP1 として発現したところ、ゴルジ体を含む核近縁部に局在した。次に、H-Ras と共発現した場合、RasGRP1 は RE で H-Ras と共局在した (図 1A)。この時、活性型 Ras と結合できるシグナル伝達下流タンパク質 Raf の Ras 結合ドメイン (RBD) を共発現すると、RE で H-Ras と共局在した (図 1B)。従って、RasGRP1 強制発現下では RE に局在する H-Ras は活性型を示すことが分かった。これに対して、ゴルジ体に局限し RE に安定的に局在できないパルミトイル基付加部位変異型 H-Ras (H-Ras-C181S) と RasGRP1 を共発現すると、RasGRP1 は H-Ras-C181S とゴルジ体で共局在できず、RasGRP1 の RE への集積も認められなかった (図 1C)。また、RasGRP1 を恒常活性型および恒常不活性型 H-Ras とそれぞれ共発現したところ、双方の H-Ras は RE に局在し、かつ RasGRP1 と共局在した。よって、RasGRP1 は単に不活性型 Ras に特異的に結合し活性型へ変換する役割を担っているわけではなさそうである。

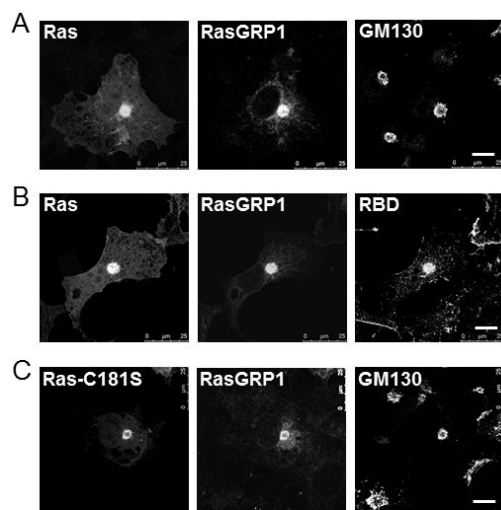


図 1. 各タンパク質の共焦点レーザー顕微鏡画像。GM130: *cis*-ゴルジ局在タンパク質。Bar: 10 μ m。

一方、アミノ酸変異を導入した不活性型変異 RasGRP1 を構築し、RasGRP1 の細胞内局在と H-Ras 活性化に及ぼす影響を調査した。不活性型 RasGRP1 を RFP との融合タンパク質として発現したところ、野生型同様に核近縁部に広い局在を示した。ところが、H-Ras と共発現した結果、野生型とは異なり RE に局在している H-Ras とほとんど共局在を示さな

った。しかも、興味深いことに不活性型 RasGRP1 存在下では、RE に局在する H-Ras は RBD と結合できない不活性型であることが分かった (図 2A)。このことから、強制発現した不活性型 RasGRP1 が内在性 RasGRP1 の機能をアナログ酵素として阻害し、結果として RE 上の H-Ras 活性化を阻害したと推定された。そこで、次に siRNA ノックダウンを利用して内在性 RasGRP1 の発現を mRNA レベルで 80% 以上抑制した細胞を準備した。このノックダウン条件下で H-Ras を強制発現したところ、コントロール siRNA を利用した対照実験では H-Ras は RE で活性型であったのに対し (図 2B)、RE に局在する H-Ras は不活性型であり RBD は H-Ras に結合できなかった (図 2C)。ところが、RE ではなく細胞膜に局在する H-Ras に RBD が結合していることを示唆する局在結果が得られた。この一連の結果をまとめると、RasGRP1 は細胞膜ではなく RE に局在する Ras を選択的に活性化しており、細胞膜での Ras 活性化とは異なる活性化機構が、RasGRP1 を通して RE に存在することを示していると言える。

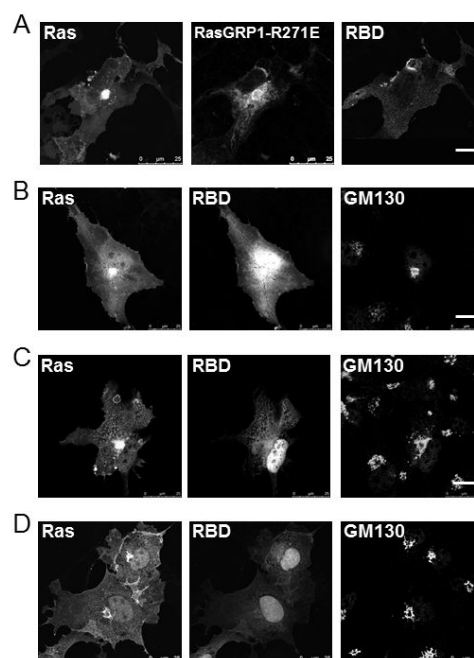


図 2. 各タンパク質の共焦点レーザー顕微鏡画像。Bar: 10 μ m。

これまでの研究で、RasGRP1 が局在するためにジアシルグリセロールがその足場として機能することが報告されている。もし、RasGRP1 が Ras を活性化するために RE へと輸送される、もしくは RE に安定的に局在するのであれば、RE へのジアシルグリセロールの集積が確認できるはずである。そこで、COS-1 細胞において、ジアシルグリセロールを特異的に認識できるタンパク質を発現し、その局在を調査したところ、期待通りジアシルグリセロールの RE への集積が観察された。さらに、細胞内のジアシルグリセロールおよびカ

ルシウムイオン濃度を制御する PLC-gamma1 の発現を siRNA を利用して抑制したところ、Ras は RE に局在するものの活性化が阻害されることを見出した (図 2D)。

(2) RE 脂質環境不全が Ras 活性化に及ぼす影響の調査

RE 膜上に豊富に存在するホスファチジルセリン (PS) が RE に局在する Ras の局在や活性化にどのような影響を与えるかについて調査するため、PS 枯渇下にある細胞を準備した。先行研究において、PS 合成酵素 1 (PSS1) 遺伝子を欠損したチャイニーズハムスター卵巣細胞では細胞内 PS の含量が劇的に減少することが報告されている。そこで、本研究でも CRISPR/CAS9 システムを利用して PSS1 遺伝子をノックアウトした COS-1 細胞を構築した。その結果、ゲノム配列を解読し、標的遺伝子破壊を確認した。しかしながら、当該細胞を用いて RasGRP1 および H-Ras の局在を観察し野生型と比較したものの、それらの挙動は変化がなかった。また、Ras シグナル伝達下流に位置する Erk のリン酸化をウエスタンブロッティングで調査したが、野生株と PSS1 欠損株で大きな差は認められなかった。これらの結果から、おそらく RE 膜に存在する PS は RE での RasGRP 局在や Ras 活性化には影響を与えないと考えられる。一方で、当該 PSS1 破壊細胞の細胞内 PS 含量がどの程度まで減少しているのか正確なデータが得られていないため、この点において今後の綿密な調査が必要である。

本研究課題において、ジアシルグリセロールの RE 集積、RasGRP1 の RE への局在、RE での Ras 活性型の局在から、RE 発シグナル伝達機構が存在するという仮説を裏付ける重要な成果が得られたと考える。また、PSS1 遺伝子ノックアウト細胞を構築したことで、RE 膜の PS が Ras 局在および活性化に影響を与えないことが分かった。今後、RasGRP1 と相互作用する分子を取得するなど、Ras 活性化機構に必須となる因子の存在を明らかにしていく。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

日本生物工学会 2015 年度大会

「RasGRP1 及び PLC-gamma1 はリサイクリングエンドソームに局在する Ras の活性化に関わる」

松本健司、糸川和貴、森将人、三崎亮、大橋貴生、藤山和仁

BMB2015

「リサイクリングエンドソームでの Ras の活性化には RasGRP1 が必要である」

松本健司、糸川和貴、森将人、三崎亮、大橋貴生、藤山和仁

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三崎 亮 (MISAKI, Ryo)

大阪大学・生物工学国際交流センター・講師

研究者番号: 20571186

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: