

セミンタクト細胞を用いたRab6Aのゴルジ体ターゲティング過程の再構成とその作用機序の研究

著者	松戸 真理子
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073245

論文の内容の要旨

論文題目 セミインタクト細胞を用いた Rab6A の ゴルジ体ターゲティング過程の再構成と その作用機序の研究

氏名 松戸 真理子

低分子量GTP結合タンパク質は、グアニンヌクレオチドと結合しGTP加水分解酵素活性を持つタンパク質のうち、20-25 kDa程度のタンパク質である。Rabタンパク質は、低分子量GTP結合タンパク質に属するRasスーパーファミリーの中でも最大のファミリーを構成しており、哺乳動物細胞では60種類以上が同定されている。個々のRabタンパク質は、それぞれが機能する特定のオルガネラにターゲティング・局在し、細胞内の輸送小胞による輸送のさまざまな段階を制御している。Rabタンパク質は、活性型（GTP結合型）の時にRabエフェクタータンパク質と呼ばれるタンパク質と相互作用し、協調して輸送のさまざまな段階の制御を行う。Rabタンパク質が特定のオルガネラに正確にターゲティング・局在することは、Rabタンパク質の機能発現のためにも重要である。しかし、Rabタンパク質のオルガネラターゲティングの分子機構は複雑であり、未だ明らかになっていない部分も多い。

本研究では、Rabタンパク質のうち、Rab6Aに注目した。Rab6Aは、Rab6のアイソフォームの1つであり、ゴルジ体の中間嚢、トランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワークに局在し、主にゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路に関与していると報告されているRabタンパク質である。本研究では、Rab6Aのオルガネラターゲティングに関わる細胞質タンパク質を探索・解析する

ことを目的として、セミインタクト細胞を用いてアッセイを構築した。セミインタクト細胞とは、孔形成毒素などを用いて、形質膜を部分的に透過性にした細胞である。セミインタクト細胞アッセイでは、細胞に、別に調製した細胞質成分やタンパク質などを加えてインキュベートすることで、添加した細胞質成分に依存的な細胞内現象を再構成・可視化することができる。さらに、さまざまな条件下の細胞から調製した細胞質成分、リコンビナントタンパク質、抗体などを細胞に加えて、その影響を検証することもできるため、再構成した細胞内現象に必要な因子を探索し、その因子について解析・検証を行うことができる。セミインタクト細胞アッセイでは、タンパク質が機能発現する場所を可視化解析することができるため、Rab タンパク質のオルガネラターゲティング機構の解析に最適な系であると考えられる。

まず、Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関与する細胞質因子を探索するため、セミインタクト細胞アッセイを用いて、大腸菌から調製した glutathione S-transferase (GST) 融合 Rab6A タンパク質 (GST-Rab6A) の細胞質依存的なゴルジ体ターゲティング過程の再構成を行った。はじめに、セミインタクト細胞に、GST-Rab6A、ATP 再生系、glucose、GTP、および細胞質を加えてインキュベートした後、細胞を固定し、蛍光抗体法により GST-Rab6A の局在を検出した。GST-Rab6A のターゲティング量を定量したところ、GST-Rab6A は細胞質依存的に核近傍領域へターゲティングすることが分かった。続いて、GST-Rab6A がターゲティングする領域を解析したところ、GST-Rab6A は、内在性 Rab6 の細胞内局在と同様に、ゴルジ体の特にトランスゴルジ層およびトランスゴルジネットワークに強くターゲティングすることが確認された。以上の結果から、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程が再構成されるとともに、制御因子が細胞質成分に存在することが示唆された。さらに、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングの細胞質濃度依存性や時間依存性について検証し、GST-Rab6A のターゲティングを可視化解析する「ゴルジ体ターゲティングアッセイ」を構築した。

続いて、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに必要な因子を探索・同定するため、細胞質から GST-Rab6A 結合タンパク質を抽出し、このタンパク質群が GST-Rab6A のターゲティングに関与するかどうかを検討した。まず、GST-Rab6A 結合タンパク質が除去された細胞質を調製し、構築したアッセイを用いて検証したところ、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティング量が大幅に減

少することが分かった。この結果から、細胞質から除去された GST-Rab6A 結合タンパク質が、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングに関与していることが示唆された。この結果を踏まえ、次に、細胞質から除去された GST-Rab6A 結合タンパク質群の中から、Rab6A に特異的に結合したタンパク質を見つけることで、Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御に関わる候補因子の探索・同定を行った。その結果、約 100 kDa のタンパク質が見出された。このタンパク質を、質量分析法により解析したところ、Bicaudal-D (BICD) 2 であることが同定された。これらの結果から、Rab6A と結合する細胞質タンパク質が、セミインタクト細胞において GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングを制御しており、細胞質タンパク質 BICD2 がその制御を行う候補因子であることが示唆された。

続いて、生細胞（インタクト HeLa 細胞）において、低分子干渉 RNA による RNA 干渉法を用いて解析を行った。これにより、内在性 Rab6 の細胞内局在および膜結合に対する BICD2 の関与について検証した。その結果、BICD2 ノックダウンにより、ゴルジ体領域あるいは膜画分に存在する Rab6 の割合が有意に減少することが分かった。これらの結果から、BICD2 は内在性 Rab6 のゴルジ体局在を制御していることが示唆された。

次に、BICD2 の機能を検証するため、構築したアッセイを用いて、抗 BICD2 抗体あるいはマウス BICD2 の His 融合リコンビナントタンパク質 (His-mBICD2) を加えた細胞質の、GST-Rab6A のターゲティングに対する影響を解析した。その結果、抗 BICD2 抗体を添加した細胞質存在下では、GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングが阻害され、His-mBICD2 を加えた条件下では、ターゲティング量が有意に増加することが確認された。以上の結果から、セミインタクト細胞において、BICD2 が GST-Rab6A のゴルジ体ターゲティングを促進していることが示唆された。

続いて、Rab6A のゴルジ体ターゲティングの動的平衡に対する BICD2 の関与を、光褪色後蛍光回復法を用いて検証した。既知の BICD2 の Rab6A 結合領域 (C 末端領域) および green fluorescent protein (GFP) を融合させた Rab6A (GFP-Rab6A) を共発現させた細胞を用いて解析した結果、細胞質領域-ゴルジ体間の GFP-Rab6A の交換速度が大幅に低下することが確認された。この結果から、BICD2 の C 末端領域が、ゴルジ体膜に結合する GFP-Rab6A の膜結合の安定化を促進している可能性が示された。

さらに、膜結合を安定化させる方法として、BICD2 が Rab6 を GTP 結合型に安定化させている可能性を検討した。GTP 結合型 Rab6 (Rab6-GTP) の発現量を解析したところ、BICD2 ノックダウン細胞では、Rab6 に対する Rab6-GTP の割合 (Rab6-GTP/Rab6) が減少した。この結果から、BICD2 は Rab6 を GTP 結合型に安定化させることが示唆された。

最後に、Rab6A の機能に対する BICD2 の影響を明らかにするため、ゴルジ体を起点あるいは経由する順行・逆行輸送経路について解析を行った。この解析では、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路について検討するため、細胞のブレフェルジン A (brefeldin A: BFA) 処理を行い、ゴルジ体のプローブとして GFP 融合 galactosyltransferase を用いて解析を行った。その結果、Rab6 ノックダウンあるいは BICD2 ノックダウンによって、BFA 処理によって誘導されるゴルジ体消失過程のうち、ゴルジ体から生じる管状構造の小胞体との融合段階が阻害されることが確認された。この結果から、BICD2 が Rab6 と複合体を形成し、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路の、特にゴルジ体由来の輸送小胞と小胞体膜との融合段階に関与している可能性が示された。

本研究では、セミインタクト細胞アッセイを用いて、Rab6A のゴルジ体ターゲティング過程を可視化解析するアッセイを構築した。続いて、BICD2 を Rab6A のゴルジ体ターゲティング制御の候補因子として同定し、詳細な解析を行った結果、BICD2 が Rab6A のゴルジ体ターゲティングを制御していることが示され、特に Rab6A のゴルジ体膜への結合安定化に関与していることが示唆された。さらに、BICD2 が制御する Rab6A の機能の生理的意義を解析した結果、BICD2 が Rab6 依存的なゴルジ体から小胞体への逆行輸送経路の、特にゴルジ体由来の輸送小胞と小胞体膜との融合段階に関与している可能性も示された。構築したアッセイは、Rab6A だけではなく、60 種類以上存在する他の Rab タンパク質を含む、多くの細胞質タンパク質のオルガネラターゲティングアッセイに適用することができる。そのため、多くのタンパク質の特定オルガネラへのターゲティング機構に関わる因子を解析する、汎用性の高いアッセイ系としての応用が期待できる。