

# 分解経路における Rab7 の活性制御機構の FRET センサーを用いた解析

## Analysis of regulation-mechanism of Rab7 activity during degradation pathway by using FRET sensors

東京理科大学 中村岳史

細胞は様々な膜系により構成されており、それらが小胞輸送を介して情報と物質の交換を行なって生命活動を維持し、神経や免疫などの高次機能を支えている。従って小胞輸送システムが破綻することで種々の疾患が生じてくる。細胞内消化の場であるリソソームもそうした膜系のひとつであり、その機能異常により種々の疾患が生じる。中でも、リソソームに存在する分解酵素の欠損による各種の蓄積症がよく知られており、それぞれに研究が進んでいる。一方で、リソソーム自体の形成や細胞内配置の異常もまた、神経変性疾患、がん、感染症等と直接関係していることが明らかになっているが、リソソーム動態の制御機構についてはまだ多くの部分が不明のままである。そのリソソームの動態を制御するキー分子が Rab7 と Rab34 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 と Rab34 による後期エンドソームとリソソーム動態（形成と細胞内配置）の制御の解析を行うことを目指して研究を行った。

2011 年に共同研究者である松田道行教授（京都大学）のもとで開発された EV リンカーを用いた FRET センサーのデザインを基に、さらにいくつかの新たな工夫を加えることで、本研究で新たに 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いる。またこのセンサーは Rab7 と同じ細胞内局在を示す。このセンサーを使った COS7 細胞での解析により、不活性型の Rab7 が膜上に相当数存在する、つまり「Rab7 の膜 - 細胞質間の局在変化はその活性変化を必ずしも反映しない」という、定説を覆す結果を得た。さらに生化学的解析の結果も合わせて、従来の 2 状態モデルに代わる「Rab 分子の局在 - 活性の 4 状態遷移」モデルを提案したいと考えている。

さらにモデル系として、上皮細胞成長因子で刺激した 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解析を行った。それにより主に 3 つの結果が得られた。①Rab5 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。②Rab7 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。③マクロピノサイトーシスにおいては、Rab5 の局所活性（より正確には活性化因子と不活性化因子のバランス）と Rab5 のリクルートがずれている。これらの知見は従来の説と大きく異なっている。これがマクロピノサイトーシスに限られた特性であるのか、またこのような知見をマクロピノソームの成熟（後期エンドソームを経てリソソームに至る過程）の制御とどう機能的に結びつけることができるのかという点が今後の重要な課題である。