

## 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

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者	東京理科大学	中村 岳史	Tokyo University of Science	Takeshi NAKAMURA
協同研究者	東北大学	福田 光則	Tohoku University	Mitsunori FUKUDA
	英国がん研究所	J.P. スキャボ	Cancer Research UK	Giampietro SCHIAVO

Lysosomes are not only cellular incinerators but also have a much broader function and they are involved in fundamental processes such as autophagy and energy metabolism, secretion, plasma membrane repair, and signaling. Rab7 is a Rab family GTPase that is essential for dynamic regulation of lysosome and late endosome in endosome maturation. It is generally thought that the replacement of Rab5 by Rab7 “Rab5 to Rab7 conversion” is a crucial event during endosome maturation. However, its mechanism is largely unknown in mammalian cells. In this study, we developed a novel FRET sensor for Rab7 and examined Rab7 activity during endosome maturation. At first, we made a new design for FRET sensors, called MeV linkers, based on the recently-developed EV linker design. By using MeV linkers, we developed a novel FRET-based sensor for Rab7 (Raichu-A441). The dynamics range of FRET/CFP ratio of Raichu-A441 is 47%. We confirmed that Raichu-A441 responded to Rab7GAP in 293F cells. GTP loading assay showed that Raichu-A441 have a comparable GTP loading to that of EGFP-fused Rab7. Co-expression of Raichu-A441 and mRFP-Rab7 showed that Raichu-A441 have the same intracellular localization as Rab7. We are now investigating the recruitment and activity-change on macropinosomes in EGF-stimulated COS7 cells.

#### 研究目的

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。

#### 研究経過

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 extended variable (EV) リンカーを用いた FRET センサーのデザイン (Komatsu et al. Mol. Biol. Cell 22, 4647-4656, 2011) 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。特に効果があったのは、従来の EV リンカーに加えて、FRET センサーの第 1 コンポーネントと第 2 コンポーネントの

間、及び第3コンポーネントと第4コンポーネントの間の2か所に15アミノ酸(GGSGGGSGGGSGG)のリンカーを挿入するという工夫である。私たちはこの手法を MeV (Modified EV) linkers と名付けた。2つの蛍光団の間での共鳴エネルギー移動の効率はその間の距離と蛍光団の dipole の成す角度の2つで決まることが知られている。もともと EV linker の発想は角度の影響をできるだけ抑えて、蛍光団間の距離のみで FRET 効率が決まるようにすることでデザインの汎用性を高めるというものであった。MeV linkers はその考え方をさらに拡張したものであり、現在ほかの複数のセンサーについても、このデザインの有効性を検討している。

次に、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た。まず、センサー(野生型、恒常活性型、優勢劣性型)を発現させた 293F 細胞の蛍光スペクトルを蛍光分光光度計で計測した。その結果、この FRET センサーは 47% という十分大きなダイナミックレンジを持つことがわかった。経験的に、このダイナミックレンジが 30% を超えることがイメージングに使用できる目安であり、その目標値を達成できた。また、この FRET センサーの FRET/CFP 比が Rab7 の不活性化因子の量依存的に低下することを確認した。さらに、細胞中での FRET センサー内の Rab7 の GTP/GDP 比を求めて、単に蛍光蛋白質をつけただけの Rab7 の GTP/GDP 比と比較するために、正リン酸を使った GTP loading assay を行った。EGFP と融合させた Rab7 の野生型/恒常活性型/優勢劣性型の GTP/GDP 比がそれぞれ 36.6%、57.3%、0.5% であったのに対し、野生型/恒常活性型/優勢劣性型の Rab7 センサーの GTP/GDP 比は 37.1%、54.0%、1.6% であり、このセンサーの動作を生化学的手法で示すことができた。次に、このセンサーは Rab7 と同じ細胞内局在を示すことを FRET センサーと mRFP-Rab7 を COS7 細胞に同時に発現させて顕微鏡観察することにより確認した。どちらも後期エンドソーム及びリソソームと思われる核周辺から細胞外縁部に広がって存在する小胞、および細胞質に存在した。

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 RabGDI との結合能の比較など生化学

的解析の結果も合わせて、従来の2状態モデル (Rab 分子は膜に存在する活性型-GTP 型と細胞質に存在する不活性型-GDP 型の2つの状態を行き来するというモデル) 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。

## 考察

従来の2状態モデルは広く受け入れられているが、その考え方がどこまで妥当かについては実はこの10年以上にわたって議論が続けられている。特に、いくつかの Rab (Rab9 など) を RabGDI から乖離させて Rab を膜へと持ってくる GDF (GDI dissociation factor) についてはいくつか具体的な候補も単離されており (Dirac-Svejstrup et al. EMBO J 16, 465-472, 1997)、膜上にはある程度の GDP 型-Rab が存在するという見方は根強く存在してきた。しかしながら、そのデータは主に生化学的な再構成系を用いて得られたものであり、実際に細胞内でどういう状況になっているかについてはほとんど情報が存在しなかった。本研究で開発された Rab7 センサーの意義はここにある。細胞内で空間的な Rab7 の活性分布を詳細に検討することにより、「膜上にはある程度の GDP 型-Rab7 が存在すること」と「細胞質にも GTP 型-Rab7 が存在すること」を支持するかなり信頼性の高い実験結果を得ることができた。今後はまず、今回の解析を行った COS7 細胞以外での解析を進めて、どの程度この見方が一般化できるかを確認する必要がある。また、2状態モデルから4状態遷移モデルへと移行することにより、少なくとも2つの新

たな制御因子が存在することが示唆される。実はそのうちのひとつは GDF やその類似分子である可能性が高いが、もうひとつの過程を制御する因子については現時点で全く手がかりが存在しない。この分子の実体を明らかにすることが今後の大きな課題である。また、今回は主にマクロピノサイトーシスでの解析を行ったが、この系で形成されるマクロピノソームはリソソームへと成熟することが知られており、その成熟過程での Rab7 活性の検討や、その活性変化が成熟過程にどう影響するかなどは今後の重要な課題である。すでに得られたいくつかの知見についても、これらの知見が従来の説と大きく異なっているため、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について調べることは細胞生物学一般の問題として興味深いと考えられる。

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 大西悠希、川崎司人 安田さや香、新井孝夫、中村岳史: マクロピノサイトーシスにおける Rab5 の活性制御の解析、日本バイオイメーキング学会第 21 回大会、2012
2. 安田さや香、川崎司人、大西悠希、中村岳史: マクロピノサイトーシスにおける Rab5 の活性制御の解析、第 35 回日本分子生物学会年会、2012
3. 中村岳史: 膜輸送を制御するシグナルの動態を可視化する、第 8 回スフィンゴセラピィ研究会

### 誌上発表

なし