

多く同定され、左右脳半球間や脳の高次領域への二次神経は同定されなかった⁹⁾。このような、それぞれの情報経路に特徴的な神経回路の構造は、哺乳類が音や重力の情報を処理する神経回路の構造^{11,12)}と良く類似している (図3)。

おわりに

ハエと哺乳類では、音や重力を受容する末梢感覚器である「耳」の形態は大きく異なっている。しかし、今回の私たちの研究から、音や重力の情報を処理する神経回路の構造は、意外にも両者で似通っていることが判明した。類似の感覚情報を処理する神経回路の構造に収斂進化が起こった可能性があり、興味深い。今後、音や重力情報を処理する動物一般に適用可能な神経回路基盤の解析モデルとして、さらに高次の神経回路の同定や機能解析も可能なショウジョウバエの脳の利用が進むと期待される。

- 1) Brand, A.H. & Perrimon, N. (1993) *Development*, 118, 401-415.
- 2) Lai, S.L. & Lee, T. (2006) *Nat. Neurosci.*, 9, 703-709.
- 3) Pulver, S.R., Pashkovski, S.L., Hornstein, N.J., Garrity, P.A., & Griffith, L.C. (2009) *J. Neurophysiol.*, 101, 3075-3088.
- 4) Sanes, J.R. & Zipursky, S.L. (2010) *Neuron*, 66, 15-36.
- 5) Wilson, R.I. & Mainen, Z.F. (2006) *Annu. Rev. Neurosci.*, 29, 163-201.
- 6) Ebbs, M.L. & Amrein, H. (2007) *Pflugers Arch.*, 454, 735-747.
- 7) Tauber, E. & Eberl, D.F. (2003) *Behav. Processes*, 64, 197-210.
- 8) Kamikouchi, A., Shimada, T., & Ito, K. (2006) *J. Comp. Neurol.*, 499, 317-356.
- 9) Kamikouchi, A., Inagaki, H.K., Effertz, T., Hendrich, O., Fiala, A., Göpfert, M.C., & Ito, K. (2009) *Nature*, 458, 165-171.
- 10) Yorozu, S., Wong, A., Fischer, B.J., Dankert, H., Kernan, M.J., Kamikouchi, A., Ito, K., & Anderson, D.J. (2009) *Nature*, 458, 201-205.
- 11) Cant, N.B. & Benson, C.G. (2003) *Brain Res. Bull.*, 60, 457-474.
- 12) Büttner-Ennever, J.A. (1999) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 871, 51-64.

上川内 あづさ

(東京薬科大学 生命科学部 脳神経機能学研究室)

Exploring the neural circuits for sound and gravity senses in the fruit fly

Azusa Kamikouchi (School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan)

酵母分泌経路における Rab-GEF カスケードの調節

1. はじめに

細胞内小胞輸送は、多岐にわたる細胞機能—細胞外からの栄養の吸収、神経伝達物質の分泌、細胞極性の構築・維持など—を果たす上で重要な役割を担っている。低分子量 G タンパク質である Rab タンパク質は、細胞内小胞輸送を制御する中心的な因子である。Rab は活性型である GTP 結合型と、不活性型である GDP 結合型の二つのコンフォメーションを行き来する分子スイッチとして機能する。GDP 結合型から GTP 結合型への変換は、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) により行われる。一方、GTP 結合型から GDP 結合型への変換は Rab 自身の GTP アーゼ活性により GTP が加水分解されることによって起こり、この反応は GTP アーゼ活性化タンパク質 (GTPase-activating protein, GAP) により促進される。

GTP 結合型の Rab は多くのタンパク質と相互作用し、これらの結合タンパク質はエフェクターと呼ばれる。エフェクタータンパク質は、小胞の出芽、細胞骨格に沿った小胞の移動、小胞の繫留およびターゲット膜との融合、といった細胞内小胞輸送の一連のステップを制御する¹⁾。

ホスファチジルイノシトール (phosphatidyl inositol, PI) はイノシトール環の 3, 4, 5 位がリン酸化されることにより親水性頭部の異なったリン脂質種に変換され、それらは細胞内で特徴的な分布を示す。3 位がリン酸化されたホスファチジルイノシトール 3-リン酸 (PI3P) はエンドソームに、4 位がリン酸化されたホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) は主にゴルジ体に局在する。オルガネラからオルガネラへの小胞輸送においては、これら PI が重要な役割を担っていることがよく知られている²⁾。

酵母 Sec4 は Rab として初めて同定されたタンパク質であり、エキソサイトーシス経路の最終ステップを制御する因子である。Sec4 の機能にはその特異的 GEF である Sec2 による活性化が不可欠である。本稿では Sec2 が PI4P との結合によって Rab-GEF カスケードの調節を行うことを示した最近の筆者らの報告を中心に、酵母エキソサイトーシス経路について概説する³⁾。

2. 酵母エキソサイトーシス経路と Rab-GEF カスケード

酵母エキソサイトーシス経路においては、三つの Rab タンパク質：Ypt1 (mRab1), Ypt31/32 (mRab11), Sec4 (mRab8) が機能することが報告されている。Ypt1 は小胞体からゴルジ体への輸送に、Ypt31/32 はゴルジ体からの小胞の出芽を担っていると考えられている⁴⁾。

Sec4 は分泌小胞上に存在し、少なくとも以下の三つの機能を果たすことが分かっている。Sec4 は、1) モータータンパク質である V 型ミオシン Myo2 をリクルートし、アクチン骨格に沿った分泌小胞の移動を制御する。2) エクソシスト複合体の構成因子 Sec15 と結合し、分泌小胞と細胞膜とをつなぎとめる「繫留」と呼ばれるステップを制御する。3) SNARE タンパク質の調節因子 Sro7 と結合し、分泌小胞と細胞膜との融合を促進する。これらのすべての機能を果たすために、Sec4 はその GEF である Sec2 によって活性化されることが不可欠である。

酵母 Sec2 は 759 アミノ酸から成り、アミノ末端の 160 アミノ酸からなるコイルドコイル型 GEF ドメインが Sec4 の活性化を行う^{5,6)}。Sec2 はアクチン依存的にエキソサイトーシス部位に濃縮して局在し、その局在にはカルボキシル末端側に存在する 58 アミノ酸の領域が必要であることが明らかになっている⁷⁾。この領域に点変異を持つ変異株 *sec2-78* における Sec2 の局在を回復させる因子を過剰発

現プラスミドを用いてスクリーニングした結果、Ypt31/Ypt32 が同定された⁸⁾。Ypt31 と Ypt32 は 80% のホモロジーを有し、重複した機能を持つタンパク質である。

Ypt32 過剰発現によって *sec2-78* 変異株での Sec2 の局在および温度感受性が回復したことから、両者の間に物理的相互作用があるか調べたところ、Sec2 は活性型 Ypt32 に直接結合した。Sec2 は Ypt32 に対して GEF 活性を持たず、また Ypt32 の結合によって Sec2 の Sec4 に対する GEF 活性は変化しなかった。よって、Sec2 は Ypt32 のエフェクターであり、さらに次の Rab である Sec4 を活性化させる GEF として機能する。

このメカニズムは「Rab-GEF カスケード」と呼ばれ、活性型の Rab によって次の Rab タンパク質の GEF が膜近傍にリクルートされ、効果的に連続的な Rab タンパク質の活性化をひき起こすことが可能になる (図 1)。同様のメカニズムはエンドソームにおいても保存されている。哺乳類細胞では、活性型 Rab5 によって HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) 複合体がリクルートされ、Rab5 の次に機能する Rab7 の GEF として機能する⁹⁾。しかしごく最近、酵母およびショウジョウバエを用いた解析から、HOPS ではなく Mon1-Ccz1 (monensin sensitivity, calcium caffeine zinc sensitivity) 複合体が Rab7 の GEF として機能することが示された^{10,11)}。

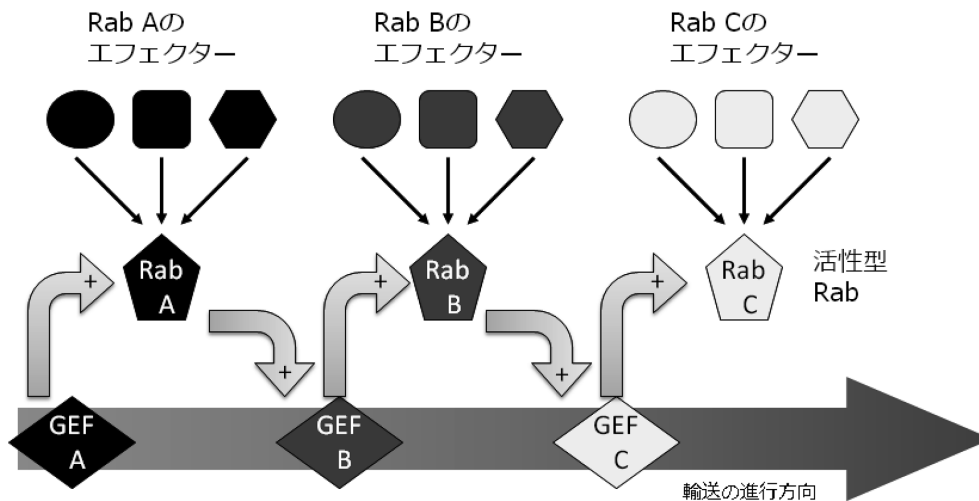


図 1 Rab-GEF カスケードモデル

GEF によって活性化された Rab は、様々なエフェクター分子をリクルートすることにより小胞輸送の様々なステップを制御する。活性型 Rab は、その下流で機能する Rab の GEF を膜近傍にリクルートする (GEF B は Rab A のエフェクター)。このことにより、Rab が効率的に活性化されることが可能になる。

3. Sec2の局在メカニズム

上に述べたとおり, Ypt32がSec2の膜へのリクルートに重要な役割を果たすことが示唆されていたものの, 直接的な証拠はこれまで示されていなかった. そこで筆者らはSec2のYpt32結合部位に点変異を導入し, Ypt32の結合が低下する変異体を単離した. この変異体Sec2は正常に局在せず, 変異株では分泌経路が阻害された. Ypt31/32の機能阻害株においてもSec2は正しい局在を示さなかったことから, Ypt32結合能がSec2の局在および機能に必須であることが示された.

以前から単離されていたSec2の変異株 (*sec2-59*; アミノ酸1-374からなる欠失変異体, *sec2-78*; C483Y点変異体) ではSec2は正しい局在を示さず, ゴルジ体以降の分泌経路が大幅に阻害される. しかしながら, これらの変異体はYpt32の結合部位とは全く異なる部位に変異を持つため, 膜へのリクルートを調節する第二の因子が存在するのではないかと考えられた.

ゴルジ体に局在するPI4-キナーゼPik1は, Sec2を含む多くのエキソサイトーシス関連因子と遺伝的相互作用を示し, またその変異株*pik1-101*ではゴルジ体以降の輸送に異常が起こる¹²⁾. そこで*pik1-101*変異株においてSec2の局在を調べたところ, Sec2のエキソサイトーシス部位への局在は観察されなくなった. また, 実際にSec2とPI4Pとは直接結合することがリポソームを用いた実験から明らかになった. 従って, ゴルジ体において生成されたPI4PがSec2の局在に重要であることが示唆された.

Sec2のPI4P結合部位を同定した結果, アミノ酸374-508の間に存在する正電荷を持つアミノ酸に富む領域であることが明らかになった. この領域は以前の解析からSec2の局在に重要であることが既に指摘されていた領域であった⁷⁾. これらの正電荷を持つアミノ酸をアラニンに置換した変異体Sec2は正常な局在を示さなかったことから, PI4PがSec2の局在を制御するもう一つの因子であることが示された.

さらに, 活性型Ypt32はPI4Pと直接結合しないが, Sec2の存在下においてこれら三つの因子が複合体を形成することを見出した. 以上の結果から, ゴルジ体のPI4PがYpt32と協調してSec2のリクルートを行っていることが示された.

哺乳類細胞のエンドソームで機能するRab5もまた, PI3Pと協調して様々な分子をリクルートすることが知られている¹³⁾. 活性型RabとPIによる細胞内輸送の調節は,

高度に保存されたメカニズムであると考えられる.

4. PI4PによるSec2結合パートナーの調節

近年, Sec2はエクソシスト複合体の構成因子Sec15と結合することが明らかになった¹⁴⁾. エクソシスト複合体は八つのタンパク質から成る巨大な複合体で, 分泌小胞と細胞膜とを繋留する. このステップはSNAREによる膜融合の前段階として必須である. Sec15はもともと, GTP結合型のSec4に結合するタンパク質であることから, Sec4のエフェクターであることが知られていた¹⁵⁾. Sec15がSec2とも直接結合することから, Rab (Sec4)・GEF (Sec2)・エフェクター (Sec15)の三者が複合体を形成する. このことにより, 活性化されたRabがエフェクターをリクルートし, さらにエフェクターがGEFをリクルートし再びRabの活性化を行うことが可能となり, いわゆる正のフィードバック制御が起こる.

Sec15とYpt32はSec2の同じ部位に競合的に結合するが¹⁶⁾, Sec2がどのようにこれらのタンパク質の結合を選択しているのかは不明であった. そこで筆者らはPI4Pがその選択を行う因子である可能性を調べるために, PI4Pリポソーム存在下においてSec2とYpt32あるいはSec15との結合実験を行った. Sec2とYpt32の結合には変化が見られなかったが, Sec2とSec15の結合はPI4Pによって大幅に阻害された. さらに, PI4キナーゼの機能阻害株*pik1-101*を用いてPI4Pの濃度が低い状態を作り出すと, Sec2とSec15は細胞内でより効率的に結合することが分かった. これらの観察から, ゴルジ体においてSec2とSec15との結合はPI4Pによって選択的に阻害されていることが示唆された. つまり, PI4PがSec15の結合をあらかじめ阻害することで, Sec2がYpt32に結合できるようになると考えられた.

最後に, Sec2とPI4Pの相互作用を視覚的に調べるため, 両者の局在をスピニングディスク共焦点顕微鏡により解析した. Sec2の大部分はエキソサイトーシス部位である娘細胞の先端部あるいは細胞分裂溝に局在したが, これらの部位ではPI4Pとの共局在は見られなかった. 一部のSec2はゴルジ体あるいは分泌小胞と思われる点状の局在パターンを示し, そのうち約40%がPI4Pと共局在した. Sec2とPI4Pとの親和性があまり高くないことを考慮すると, Sec2は一過的にゴルジ体のPI4Pと相互作用するのではないかと考えられた. さらに, PI4Pはエキソサイトーシス部位に全く観察されなかったことから, ゴルジ体由来の小胞上では輸送が進むに連れて徐々にPI4Pの濃度が低

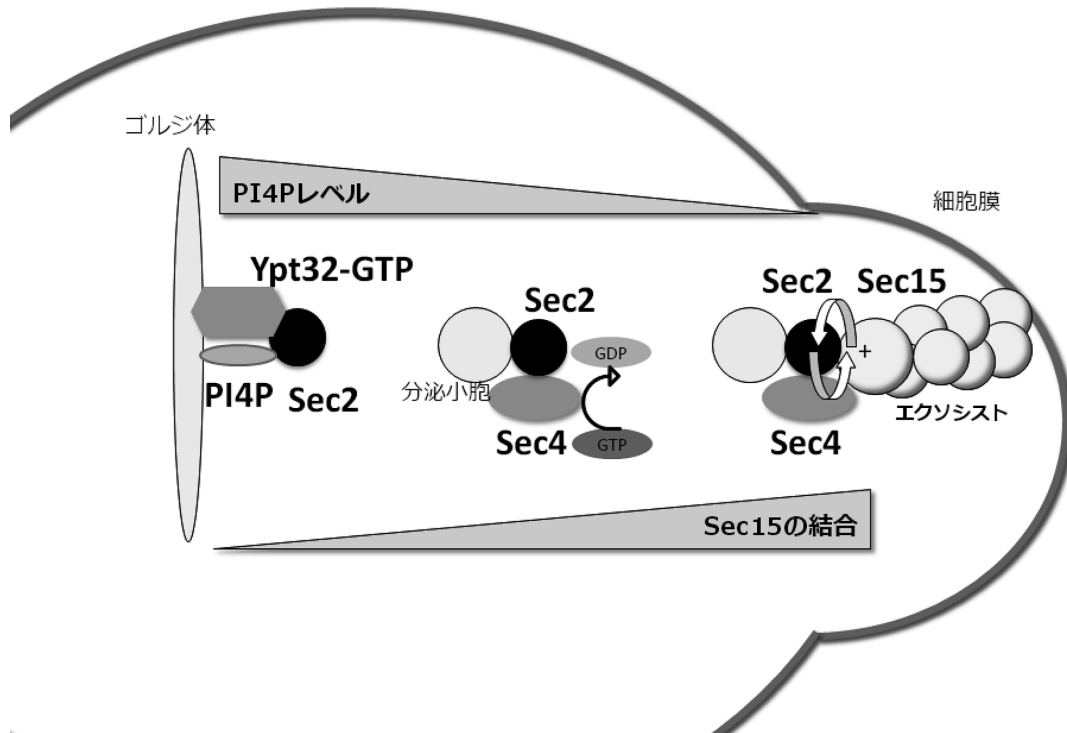


図2 Sec2によるRab-GEFカスケードおよびポジティブフィードバックの調節モデル

Sec2はPI4Pと活性型Ypt32の両方によりゴルジ膜へとリクルートされる。Sec2はSec4を活性化し、活性型Sec4はエフェクターであるSec15をリクルートする。分泌小胞上でPI4Pの濃度が低くなるにつれてSec15はSec2に結合できるようになり、ポジティブフィードバックを形成する。

くなっていくことが示唆された。

5. おわりに

以上の結果を踏まえて、筆者らは現在次のモデルを考えている(図2)。Sec2はまず、PI4Pと活性型Ypt32の両方によってゴルジ膜へとリクルートされる。この時点ではSec15はPI4PによってSec2に結合することができないため、活性型Ypt32が優先的にSec2と結合する。ゴルジ体から出芽した小胞上で、Sec2はSec4を活性化する。活性型Sec4はエフェクターであるSec15をリクルートする。エキソサイトーシス部位ではPI4Pの濃度が低いため、Sec15はYpt32に置き換わるようにしてSec2に結合できるようになる。このようにしてPI4PはSec2の結合パートナーとの親和性を調節し、Rab-GEFカスケードからSec2-Sec4-Sec15間の正のフィードバックへ切り替える。このことはエキソサイトーシスの最終ステップである分泌小胞の繫留、細胞膜への融合が効率的に行われるために重要であると考えられる。

ゴルジ体のPI4Pがエキソサイトーシスにおいて重要で

あることは知られていたが、その分子機能は長い間不明であった。今回、PI4PはSec2のリクルートおよびSec2の結合パートナーの切り替えという二つの機能を持つことが明らかになった。しかしながら、ゴルジ体を出芽した小胞に実際にPI4Pが含まれているのか、小胞上でPI4Pがどのように変化していくのかといった重要な点は依然として不明であり、今後の解析が不可欠である。

- 1) Stenmark, H. (2009) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 513-525.
- 2) Strahl, T. & Thormer, J. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, 1771, 353-404.
- 3) Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., & Novick, P. (2010) *Dev. Cell*, 18, 828-840.
- 4) Grosshans, B. L., Ortiz, D., & Novick, P. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 11821-11827.
- 5) Dong, G., Medkova, M., Novick, P., & Reinisch, K.M. (2007) *Mol. Cell*, 25, 455-462.
- 6) Walch-Solimena, C., Collins, R.N., & Novick, P.J. (1997) *J. Cell Biol.*, 137, 1495-1509.
- 7) Elkind, N.B., Walch-Solimena, C., & Novick, P.J. (2000) *J. Cell Biol.*, 149, 95-110.
- 8) Ortiz, D., Medkova, M., Walch-Solimena, C., & Novick, P.

- (2002) *J. Cell Biol.*, 157, 1005–1015.
- 9) Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005) *Cell*, 122, 735–749.
 - 10) Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., & Spang, A. (2010) *Cell*, 141, 497–508.
 - 11) Nordmann, M., Cabrera, M., Perz, A., Bröcker, C., Ostrowicz, C., Engelbrecht-Vandré, S., & Ungermann, C. (2010) *Current Biology*, 20, 1654–1659.
 - 12) Walch-Solimena, C. & Novick, P. (1999) *Nat. Cell Biol.*, 1, 523–525.
 - 13) Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., & Stenmark, H. (1998) *Nature*, 394, 494–498.
 - 14) Medkova, M., France, Y.E., Coleman, J., & Novick, P. (2006) *Mol. Biol. Cell*, 17, 2757–2769.
 - 15) Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., & Novick, P. (1999) *EMBO J.*, 18, 1071–1080.

水野-山崎 英美

(カリフォルニア大学サンディエゴ校)

Regulation of Rab-GEF cascade in yeast secretory pathway
Emi Mizuno-Yamasaki (University of California, San Diego, Department of Cellular and Molecular Medicine, 9500 Gilman Drive MC 0644, La Jolla, CA 92093-0644, U.S.A.)

がんのインビボ光イメージング

1. はじめに

近代生物学は、複雑な多細胞生物への対応として、生物個体をタンパク質や生体分子といった細かい要素に分解し、要素を部品のごとく組み立てることで生物を統合的に理解する「要素還元論」を取り入れて発展してきた。近年の網羅的オミクス技術の急速な発展は、われわれに莫大なタンパク質・遺伝子情報をもたらし、これからはその莫大な情報を再構築して統合的に生物への理解を深める必要がある。但し、要素還元論を生物学に応用するためには、対象とする生物が物理学や化学で説明できる素過程の組み合わせで実現されていることが大前提である。しかし、生物における素過程はそれ自身ですでに複雑なものであり、タンパク質や遺伝子を単なる部品として考えて生物を統合的に理解することは難しい。よってこれからは、生体における動的で複雑な細胞や分子を、その不均一性や自身が作り出す環境などを考慮し、時空間的要素を加味した研究を行う必要がある。このような研究には、これまでの生化学実

験、細胞生物学実験や病理学的解析に加え、動物が生きのまま経時的に細胞や分子の動態を解析できる *in vivo* (インビボ; 生体) イメージングが必要である。もちろん、これまでの *in vitro* 実験や *ex vivo* 実験によっても多くの知見が得られてきたが、生物の本質に迫るには、新しいテクノロジーの開発が必須と考えられる。

蛍光や生物発光を利用したインビボの光イメージングは、空間・時間分解能や特異性にすぐれ、低侵襲でより包括的に生物を理解するための新たなテクノロジーとして期待されている。以前は、生体での蛍光や生物発光の観察において、吸収や散乱などの光学特性によってさまざまな問題が生じ、深部観察が難しいという欠点があった。しかし、近年、新規蛍光タンパク質や生物発光タンパク質の発見やその遺伝子改変、新たな蛍光色素の発見やその改良、量子ドットの開発、さらに、レーザーや光学検出系などの技術開発、2光子励起顕微鏡や選択的平面照射顕微鏡など新しい顕微鏡システムの開発によって、生体での光観察技術が急速に発展しつつある。本ミニレビューでは、われわれのがん研究におけるデータを紹介しながら、インビボ光イメージング技術の生物学への応用について議論したい。

2. インビボ発光イメージングの特徴とその応用実験例

インビボ光イメージングは、生物発光を利用したインビボ発光イメージングと蛍光を利用したインビボ蛍光イメージングの二つの技術に分けることができる。インビボ発光イメージングは、ホタルや鉄道虫などの生物種が持つルシフェラーゼ酵素の生物発光反応系を動物体内で利用するので、例えばホタル (firefly) 由来のルシフェラーゼを恒常的に発現するがん細胞をマウスに移植し、基質であるD-ルシフェリンを投与すると、マウスが活着している状態で、がん細胞の体内での動態を可視化することができる。近年、超高感度 CCD カメラなど光を検出する機器と画像解析技術の発達によって、動物の体内の深部に存在する細胞から発せられる微量な光を画像として捉え、活着している動物の中のがん細胞を経時的に追跡することが可能になった。また、複数のルシフェラーゼの組み合わせ、例えば firefly ルシフェラーゼにウミシイタケ (*renilla*) 由来のルシフェラーゼを組み合わせることで、多元的イメージングを行うことが可能になってきた。

さらに、上記のような恒常的にルシフェラーゼを発現するがん細胞を用いた実験系に加え、ある特定のシグナル伝達分子のシグナル応答性プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだプロモーターレポーターを用いるこ