

# メラノソーム輸送に必須の因子 Slac2-a の分解メカニズムの解明とメラノソーム輸送制御への応用

独立行政法人理化学研究所 福田独立主幹研究ユニット

福田 光則

Slac2-a/melanophilin was recently identified as the "missing link" between the small GTPase Rab27A and the actin-based motor protein myosin Va. Formation of a tripartite protein complex by three molecules is essential for melanosome transfer from microtubules to actin filaments and subsequent actin-based melanosome transport in melanocytes. However, the regulatory mechanisms of the disassembly of the complex after actin-based melanosome transport had never been elucidated. In this study, we discovered that Slac2-a and a closely related isoform, Slac2-c, contain multiple PEST-like sequences (potential signals for rapid protein degradation) in the myosin Va- and actin-binding domains at the C terminus. We found that the C-terminal domain of Slac2-a/c is highly sensitive to low concentrations of proteases, such as trypsin and calpain, *in vitro*, whereas the N-terminal Rab27A-binding domain is highly resistant to these proteases. We further found that endogenous calpains selectively cleave Slac2-a, but not Rab27A or myosin Va, in melanocytes. A mutant Slac2-a lacking one of the PEST-like sequences located at the interface between the myosin Va- and actin-binding domains ( $\Delta$ PEST; amino acids 399-405) is more stable than the wild-type protein, both *in vitro* and in melanocytes. Expression of the mutant Slac2-a- $\Delta$ PEST with an N-terminal green fluorescence protein tag often induced perinuclear aggregation of melanosomes (approximately 40% of the transfected cells) compared with the wild-type Slac2-a. Our findings suggest that protein degradation of Slac2-a is an essential process for proper melanosome distribution in melanocytes.

## 1. 緒言

我々の体を紫外線から守ってくれるメラニン色素は、メラノサイトと呼ばれる特殊な細胞で合成され、メラノソームと呼ばれる小胞に貯蔵されている。核周辺で成熟したメラノソームは、細胞内に張り巡らされた二種類の交通網(微小管及びアクチン線維)によって細胞膜周辺へと輸送される。その後、メラノソームは隣接するケラチノサイトあるいは毛母細胞に受け渡され、皮膚や毛髪の色化が引き起こされる<sup>1) 2)</sup>。これまでの研究で、メラノソーム輸送(特に微小管からアクチン線維へのメラノソームの受け渡しのステップ)には低分子量G蛋白質Rab27A、リンカー蛋白質Slac2-a(スラックツー)及びアクチン依存性モーター蛋白質ミオシンVaの三者複合体の形成が不可欠であることが明らかになっている<sup>3)-8)</sup>。生体内でこのRab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体の形成が損なわれると、メラノソームを正しく輸送することができず、皮膚や毛髪の色化を特徴とするヒト遺伝病Griscelli症候群が発症する<sup>9) 10)</sup>。従って、もしRab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体の解離を人為的に操作することができれば、メラノソームの輸送ひいては皮膚におけるメラニン色素沈着の制御も可能と

考えられる。しかしながら、Rab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体解離の分子メカニズムはこれまで全く解明されていなかった。私達は最近、Slac2-aの分子内にプロリン(P)、グルタミン酸(E)、セリン(S)、トレオニン(T)の四つのアミノ酸からなる配列が多数存在するのを見出した(図1)<sup>11)</sup>。これらの配列は蛋白質分解のシグナルとされているPEST配列と考えられ、Slac2-a分子が選択的分解を受けることによりRab27A・Slac2-a・ミオシンVa複合体の解離が引き起こされる可能性が考えられた。そこで本研究では、メラノサイトにおいてどのようなシグナルを受けてSlac2-aが分解されるのか、Slac2-aのどの部位が切断されるのか、さらにはどのようなプロテアーゼにより選択的に分解されるのかを解明することを目指した。また、Slac2-aの相同分子で網膜上皮細胞に発現し、網膜メラノソームを輸送すると考えられているSlac2-c<sup>12) 13)</sup>に関しても同様にプロテアーゼによる分解の可能性を検討した。

## 2. 実験

### 2.1 Slac2-a/c分子のプロテアーゼによる *in vitro* 限定分解

Slac2-a及びSlac2-cは共に三つの機能ドメイン(アミノ末端側のRab27A結合ドメイン(SHD)、中央部分のミオシン結合ドメイン(MBD)、そしてカルボキシル末端側のアクチン結合ドメイン(ABD))により構成されている<sup>5) 14)</sup>。PEST様の配列はSlac2分子の中央部分からカルボキシル末端側にかけて多数存在している(図1)。アミノ末端



Elucidation of the Degradation Mechanism of Melanosomal Protein Slac2-a.

Mitsunori Fukuda

Fukuda Initiative Research Unit, RIKEN

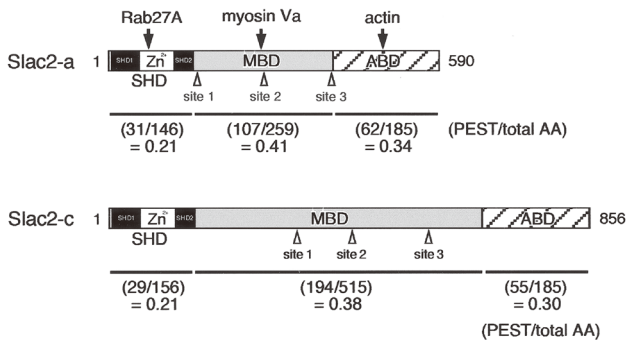


図1 Slac2-a 及び Slac2-c の分子構造と PEST 様配列  
Slac2 分子はアミノ末端側の Rab27A 結合ドメイン (SHD, synaptotagmin-like protein homology domain)、中央部分のミオシン結合ドメイン (MBD, myosin-binding domain)、カルボキシル末端部分のアクチン結合ドメイン (ABD, actin-binding domain) により構成されている。特に MBD 領域において Pro, Glu, Ser, Thr (PEST) の四つのアミノ酸の含量が多く、矢頭で示した site 1~3 でまずプロテアーゼによる分解を受けると考えられる。

側に T7 タグ、カルボキシル末端側に FLAG タグを付加したりコンビナント Slac2 分子をアガロースカラムに固定化し、低濃度のトリプシン (Sigma ; 10 ~ 250ng/ml in 50mM HEPES-KOH, pH7.2 ; 25°C , 30 分) 及び  $\mu$ カルパイン (Calbiochem; 5 ~ 500nM in 50mM HEPES-KOH, pH7.2 + 0.75mM CaCl<sub>2</sub> ; 30°C , 15 分) 溶液中でインキュベーションした<sup>11)</sup>。酵素消化後の Slac2 分子を 10% SDS 電気泳動に流し、分解の様子を抗 T7 タグ抗体 (Novagen) 及び抗 FLAG タグ抗体 (Sigma) を用いてイムノプロット法でモニターした。

## 2.2 メラノサイト内在性カルパインによる Slac2-a 分子の分解

培養メラノサイト (melan-a 細胞) は Dorothy C. Bennett 博士 (St. George's Hospital Medical School, London, UK) よりご供与頂いた<sup>15)</sup>。10 cm シャーレに培養した melan-a 細胞 (培養条件の詳細は文献 5 に記載) を 500 $\mu$ l のプロテアーゼインヒビターを含まないバッファー (50 mM HEPES-KOH, pH 7.2, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl) 中でホモジェナイズした。最終濃度 1% Triton X-100 で蛋白質を可溶化後 (4°C , 1 時間)、不溶性画分を遠心により除去した (15,000rpm, 10 分)。得られた細胞抽出液を 2 mM EGTA あるいは 0.75 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で 30°C , 1 時間インキュベーションした。反応溶液を 10% SDS-PAGE に流し、Slac2-a 分子の分解の様子を抗 Slac2-a-SHD 抗体<sup>16)</sup> を用いてイムノプロット法で評価した。また、内在性  $\mu$ カルパインによる分解を確認するため、反応溶液中に  $\mu$ カルパインインヒビター (10 $\mu$ M calpastatin peptide あるいは calpain inhibitor III、いずれも Calbiochem) を共存させて同様の

実験を行った。

## 2.3 PEST 配列欠損 Slac2-a 分子の作成

Slac2-a 分子の MBD と ABD 領域の境界に存在する PEST 様配列 (STSSSEDET : アミノ酸 399 ~ 406) を欠損させた Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体を下記の変異プライマーを用いて 2 ステップ PCR 法<sup>17)</sup> により作成した (5'-GGTACCA TCTGGCTTGGTGGAACCACTGATGTTGCTGG-3' 及び 5'-GGTACCTTCCTTGGAGGGTC-3')。作成した Slac2-a- $\Delta$ PEST の cDNA を pEGFP-C1 ベクター (BD Clontech) 及び pEF-T7 ベクター<sup>18)</sup> にサブクローニングした。Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体のプロテアーゼに対する抵抗性は上記 2.1 の手法により確認を行った。

## 2.4 メラノソーム凝集アッセイ

トランスフェクション前日に  $1 \times 10^5$  個の melan-a 細胞を 3.5 cm シャーレに培養し、2  $\mu$ g の各種発現ベクター (pEGFP-C1, pEGFP-C1-Slac2-a, pEGFP-C1-Slac2-a- $\Delta$ PEST) を 3  $\mu$ l の FuGene 6 (Roche) を用いて遺伝子導入した。二日後に細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 20 分間固定し、GFP の蛍光を指標に遺伝子導入された細胞を同定し、メラノソームの分布 (細胞膜周辺あるいは核周辺に凝集) を観察した (詳細は文献 5 を参照)。

## 3. 結果

### 3.1 PEST 配列依存的 Slac2-a/c 分子の分解

Slac2-a/c の分子内には多数の PEST 様配列が存在することから (図 1)、まずこれらが実際に蛋白質分解のシグナルとして機能するのかを検討した。リコンビナント Slac2-a 及び Slac2-c を低濃度のトリプシン及び  $\mu$ カルパインで処理すると、濃度依存的な Slac2 分子の分解が観察された (図 2)。アミノ末端側を認識する抗 T7 タグ抗体で分解過程をモニターすると、多数の分解産物が観察されたが (図 2 A, site 1~3, 白矢頭)、カルボキシル末端側を認識する抗 FLAG タグ抗体では分解産物は全く検出されず、全長の Slac2 分子のみが特異的に認識された (図 2 B, 黒矢頭)。つまり、Slac2 分子は PEST 様配列が多数存在する MBD 及び ABD の領域でプロテアーゼによる分解を受け易く、PEST 様配列を含まない SHD では分解を受けにくいことが明らかとなった。また、Slac2 分子の分解産物の分子量から類推して、Slac2 分子は MBD 領域 (PEST 含量が最も高い領域) に存在する site 1~3 でまず切断されると考えられた (図 1、矢頭)。さらに、site 3 に相当すると考えられる PEST 様配列 (STSSSEDET : アミノ酸 399 ~ 406) を遺伝子工学的手法により欠損させた Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体ではプロテアーゼに対する抵抗性が強くな

ることから、Slac2 分子の PEST 様配列が蛋白質分解のシグナルとして機能している可能性が強く示唆された<sup>11)</sup>。

次に、メラノサイトに内在性の Slac2-a 分子が実際にプロテアーゼによる分解を受け易いのかを検討してみた。予想通り、メラノサイトの細胞抽出液をカルシウム存在下で 30°C、1 時間処理すると Slac2-a 分子が選択的に分解された (図 3)。この条件下では、総蛋白質量 (アミドブラック染色)、アクチン、ミオシン Va、Rab27A のいずれにも影響が無いことから、分解は Slac2-a 分子に特異的と考えられた<sup>11)</sup>。カルシウム依存的に PEST 配列を分解するプロテアーゼの候補としては  $\mu$  カルパインが考えられたので<sup>19)</sup>、 $\mu$  カルパインインヒビター存在下で同様の実験を行ったところ、Slac2-a 分子の分解が完全に阻害された (図 3、レーン 3 及び 4)。

### 3.2 Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体によるメラノソーム凝集の誘導

Slac2-a の PEST 様配列依存的分解のメラノソーム輸送における役割を検討するため、PEST 様配列の一部を欠

損した Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体を作成し、培養メラノサイトに発現させた (図 4)。Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体は一部の PEST 様配列を欠損するため、野生型よりも安定してメラノサイトに発現し、主にアクチン線維上に蓄積していた (野生型の Slac2-a では主にメラノソーム上に存在する)。さらに、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体を発現する約 4 割の細胞でメラノソームの凝集が観察され、正常なメラノソーム分布を維持するためには Slac2-a 分子の分解が不可欠である可能性が示唆された。

## 4. 考察

モーター蛋白質ミオシン Va は積み荷であるメラノソームを直接認識するのではなく、リンカー蛋白質 Slac2-a を介してメラノソーム上の Rab27A と結合している。アクチン依存性のメラノソーム輸送が終了すると、Rab27A・Slac2-a・ミオシン Va 複合体は解離すると考えられているが、これまでその分子メカニズムは全く分かっていなかった。今回の研究により、Slac2-a 分子内には複数の

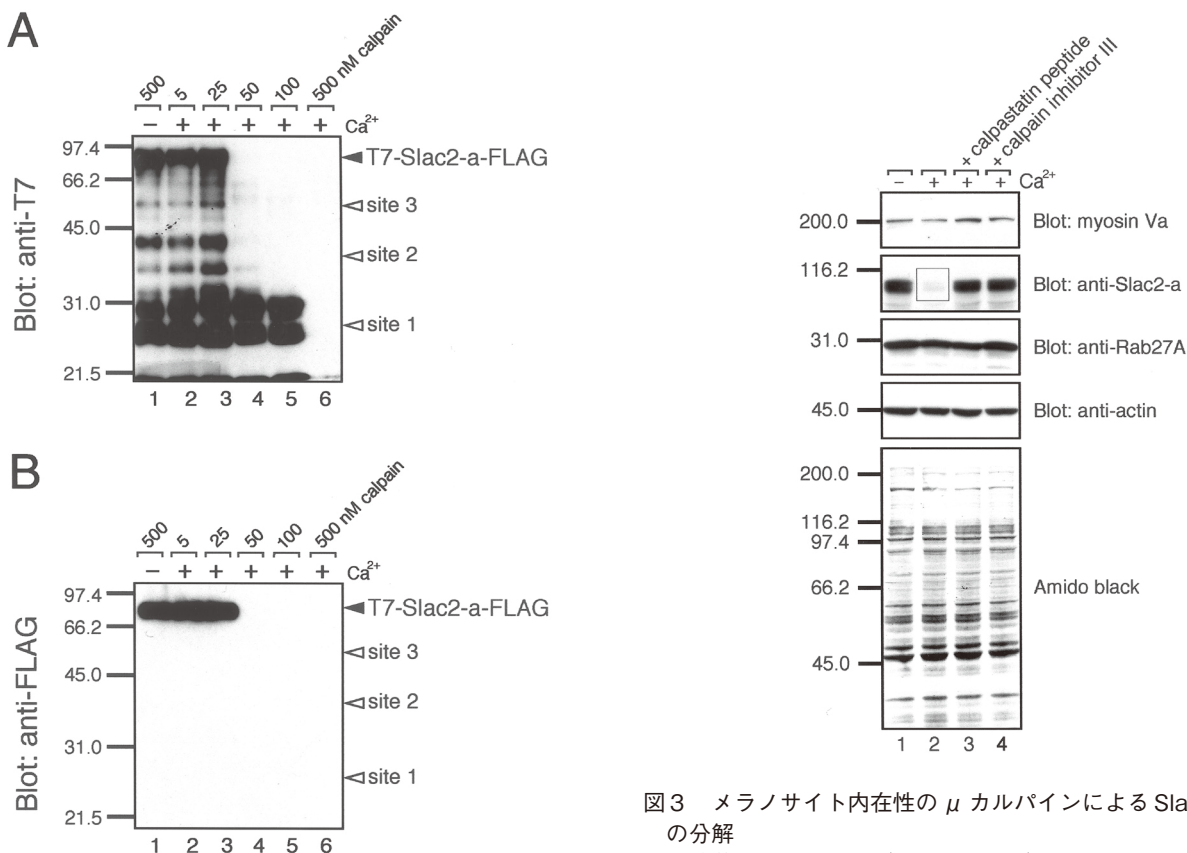


図2  $\mu$  カルパインによるリコンビナント Slac2-a 分子の分解  
精製リコンビナント T7-Slac2-a-FLAG 分子を表示量のカルシウム/ $\mu$  カルパインで処理し (30°C, 15min)、分解の様子を抗 T7 タグ抗体 (A) 及び抗 FLAG タグ抗体 (B) でモニターした。

図3 メラノサイト内在性の  $\mu$  カルパインによる Slac2-a 分子の分解

培養メラノサイト (melan-a 細胞) の抽出液を 30°C、1 時間処理すると Slac2-a 分子が選択的に分解される (二段目のパネル、四角)。この分解は  $\mu$  カルパインのインヒビターにより完全に阻害された。なお、この条件下ではミオシン Va、Rab27A、アクチン、総蛋白質量には特に影響は見られなかった。

PEST 様配列が存在し、内在性のプロテアーゼにより特に MBD の領域が選択的に分解されることが明らかとなった。MBD 領域がプロテアーゼにより分解されるとミオシン Va との結合が損なわれることから、Slac2-a 分子の分解は Rab27A・Slac2-a・ミオシン Va 複合体の解離を引き起こし、輸送終了のシグナルとして機能する可能性が十分に考えられる。「リンカー蛋白質を分解することにより積み荷を降ろす」というメカニズムは一見無駄なように思えるが、酵母の液胞輸送においては、実際に Myo2p という V 型ミオシンのリンカー蛋白質 Vac17p が PEST 配列依存的に分解されることにより、液胞輸送終了のシグナルとなることが最近報告されている<sup>20)</sup>。興味深いことに、PEST 配列を欠損した Vac17p が液胞を正しく輸送できないように、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体も頻繁にメラノソーム凝集を引き起こすことが明らかになった。詳細な阻害機構は现阶段では明らかではないが、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体は直接メラノソーム輸送を阻害するのではなく、恐らくアクチン線維上に蓄積し ABD 領域を介してアクチン線維の束化を促進することにより、微小管からアクチン線維へのメラノソームの受け渡しを二次的に阻害するのではないかと推察される。

もしこの説が正しいとすると、Slac2-a をターゲットとするプロテアーゼはアクチン依存性のメラノソーム輸送が終了する時にのみ活性化される必要がある（輸送途中で Slac2-a を分解するとメラノソーム輸送が阻害されてしまうため）。今後の重要な研究課題の一つは Slac2-a を分解するプロテアーゼ候補  $\mu$  カルパインの時空間的活性化

機構を明らかにすることである。カルパインが細胞膜近傍（すなわちメラノソームの積みおろし場）で活性化されるという報告もあり<sup>21) 22)</sup>、*in vivo* でも Slac2-a の分解制御に関与する可能性は十分にあるが、他のプロテアーゼの関与も否定はできない。今後、他の内在性プロテアーゼによる Slac2-a 分子の分解についても検討して行く予定である。

## 謝辞

本研究は理化学研究所福田独立主幹研究ユニットの伊藤敬博士、黒田垂歩博士、菅野栄子氏との共同研究で行われたもので、ここに深く感謝致します。

## (引用文献)

- 1) Marks MS, Seabra MC, : The melanosome: Membrane dynamics in black and white, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 738-748, 2001.
- 2) 黒田垂歩, 福田光則, : 美白への新たなアプローチ—メラニン輸送をストップさせる—, *BIONICS*, 2(11), 68-71, 2005.
- 3) Fukuda M, Kuroda TS, Mikoshiba K, : Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: Implications of a tripartite protein complex for melanosome transport, *J. Biol. Chem.*, 277, 12432-12436, 2002.
- 4) Wu XS, Rao K, Zhang H, *et al.*, : Identification of an organelle receptor for myosin-Va, *Nat. Cell Biol.*, 4, 271-278, 2002.
- 5) Kuroda TS, Ariga H, Fukuda M, : The actin-binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes, *Mol. Cell. Biol.*, 23, 5245-5255, 2003.
- 6) Fukuda M, Kuroda TS, : Missense mutations in the globular tail of myosin-Va in *dilute* mice partially impair binding of Slac2-a/melanophilin, *J. Cell Sci.*, 117, 583-591, 2004.
- 7) Kuroda TS, Fukuda M, : Rab27A-binding protein Slp2-a is required for peripheral, melanosome distribution and elongated cell shape in melanocytes, *Nat. Cell Biol.*, 6, 1195-1203, 2004.
- 8) 福田光則, : Slac2-a と Slp2-a : メラニン色素輸送のしくみ, *医学のあゆみ*, 212, 769-770, 2005.
- 9) Ménasché G, Pastural E, Feldmann J, *et al.*, : Mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome, *Nat. Genet.*, 25, 173-176, 2000.
- 10) 黒田垂歩, 福田光則, : リソソーム関連疾患と低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab - Rab27A とミオシン Va の運

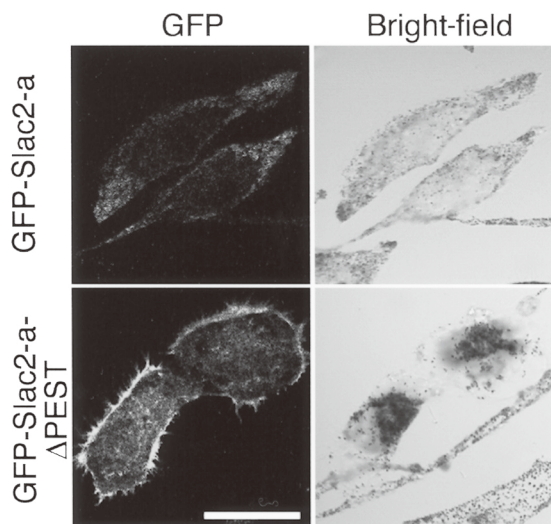


図4 Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体によるメラノソーム凝集の誘導  
野生型の GFP-Slac2-a 分子はメラノソーム上に発現し、メラノソームの分布には大きな影響を与えないが（上段）、Slac2-a- $\Delta$ PEST 変異体は野生型よりも安定に発現し（主にアクチン線維上に蓄積）、約40%の細胞でメラノソームの凝集が観察された（下段）。スケールバー、10 $\mu$ m。

- 命的出会い - , 実験医学増刊号「細胞内輸送研究の最前線」, 21, 2039-2047, 2003.
- 11) Fukuda M, Itoh T, : Slac2-a/melanophilin contains multiple PEST-like sequences that are highly sensitive to proteolysis, *J. Biol. Chem.*, 279, 22314-22321, 2004.
- 12) Fukuda M, Kuroda TS, : Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin, *J. Biol. Chem.*, 277, 43096-43103, 2002.
- 13) Kuroda TS, Fukuda M, : Functional analysis of Slac2-c/MyRIP as a linker protein between melanosomes and myosin VIIa, *J. Biol. Chem.*, 280, 28015-28022, 2005.
- 14) Fukuda M, : Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: Focus on the Rab27 effector families, *J. Biochem.*, 137, 9-16, 2005.
- 15) Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR, : A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth, *Int. J. Cancer*, 39, 414-418, 1987.
- 16) Imai A, Yoshie S, Nashida T, *et al.*, : The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells, *J. Cell Sci.*, 117, 1945-1953, 2004.
- 17) Fukuda M, Kojima T, Aruga J, *et al.*, : Functional diversity of C2 domains of synaptotagmin family: Mutational analysis of inositol high polyphosphate binding domain, *J. Biol. Chem.*, 270, 26523-26527, 1995.
- 18) Fukuda M, Kanno E, Mikoshiba K, : Conserved N-terminal cysteine motif is essential for homo- and heterodimer formation of synaptotagmins III, V, VI, and X, *J. Biol. Chem.*, 274, 31421-31427, 1999.
- 19) Goll DE, Thompson VF, Li H, *et al.*, : The calpain system, *Physiol. Rev.*, 83, 731-801, 2003.
- 20) Tang F, Kauffman EJ, Novak JL, *et al.*, : Regulated degradation of a class V myosin receptor directs movement of the yeast vacuole, *Nature*, 422, 87-92, 2003.
- 21) Schollmeyer JE, : Calpain II involvement in mitosis, *Science*, 240, 911-913, 1988.
- 22) Saido TC, Suzuki H, Yamazaki H, *et al.*, : *In situ* capture of  $\mu$ -calpain activation in platelets, *J. Biol. Chem.*, 268, 7422-7426, 1993.