

低分子量 G 蛋白質 Rab27A による メラノソーム輸送制御メカニズムの解明

東北大学大学院生命科学研究所

伊藤 敬

Rab27A is responsible for melanosome transport in melanocytes tethering melanosome to myosin Va, an actin-dependent motor protein, through Slac2-a/Melanophilin. For understanding the precise mechanism of melanosome transport, it is important to clarify how Rab27A is activated/inactivated. Furthermore, the regulatory mechanism of Rab27A is also important based on the clinical standpoint, since mutation in Rab27A causes an inherited disease of human "Griscelli syndrome". Exhaustive screening among TBC domain containing proteins revealed that EPI64 is the GAP (GTPase activating protein; inactivator) of Rab27A. EPI64 inactivates Rab27A in vivo and in vitro and overexpression of EPI64 results in melanosome aggregation in melan-a cells probably through inactivation of Rab27A. Interestingly, there are two close homologues of EPI64, FLJ13130 and mFLJ00332, in mammalian genome including human. Therefore, I investigated functional difference among these three TBC proteins.

As a consequence, I found that FLJ13130 and mFLJ00332 have other functions than EPI64. FLJ13130 inactivated and mislocalized Rab3A in PC12 cells. mFLJ00332 was involved in formation of immunological synapse in T cells. Furthermore, in vitro GAP assay revealed that FLJ13130 exhibited somewhat broad specificity and that mFLJ00332 showed specific GAP activity toward Rab35. These data indicate that there are significant differences even in the closest members among TBC proteins. These basic data will be useful for application to medical care like a drug discovery against EPI64.

1. 緒言

日本人の女性に対する美意識の中では、黒い髪、白い肌というものが古来より重要であった。現代女性にとってもシミのない白い肌を保つことが美容の中でもっとも重要なことであると言っても過言ではないだろう。また男女問わず、白髪は老化を感じさせるために敬遠される傾向が強い。このように日本人の美的感覚の中で重要な役割を担っている「黒」という色はメラニンと呼ばれる色素がもたっている（実際にはメラニン色素は黒色一種類ではないが）。このメラニン色素の合成や、いかに肌や髪を黒くするかメカニズムの解明はコスメトロジーの観点から非常に重要なテーマであると考えられる。

肌であれ、髪の毛であれ、メラニン色素は色素細胞という特殊化された細胞によって産生されている。例えば皮膚では、肌を構成している角質化細胞へ色素細胞からメラニン色素が受け渡されることで皮膚全体が黒化する。実は、皮膚における色素細胞は、数としては少なく表皮全体の2～3%のみであるため、角質化細胞へのメラニン色素の受け渡しという過程は肌の色を決めるのに重要な役割を果たしている。

色素細胞中でメラニン色素は、メラノソームと呼ばれる

オルガネラの中で合成され、貯蔵される。メラノソームは核周辺で作られ、その成熟とともにメラニン色素を蓄え黒色化し、細胞周辺部に輸送される。輸送されたメラノソームはそのまま角質化細胞へ受け渡されると考えられている。逆にこの輸送が行なわれないと、メラニン色素は角質化細胞に受け渡されない¹⁾。現在、この輸送の過程には低分子量Gタンパク質である Rab27A が関与することが明らかになっており、実際、Rab27A 変異マウスや、Rab27A に変異を持つヒト遺伝病 Griscelli 症候群の患者から単離した色素細胞では、メラノソームが核周辺に凝集するという表現型が観察され、その結果、毛髪の白色化が起こると考えられている^{2,3)}。以上のような背景から、筆者は Rab27A によるメラノソーム輸送制御メカニズムを明らかにすることで、コスメトロジーに貢献できると考えた。

一般的に、低分子量G蛋白質の不活性化は GAP (GTPase-activating protein) が GTP の加水分解を促進することで、活性化は GEF (guanine nucleotide exchange factor) が結合している GDP を GTP に変換することで行うと考えられているが、Rab27A に関してはそのどちらもこれまで同定されていなかった (図1)。筆者は、色素細胞内での Rab27A の不活性化がメラノソーム輸送を阻害することに着目し、メラノソーム輸送阻害を指標にヒトゲノム上に存在する Rab-GAP/TBC タンパク質の網羅的スクリーニングを行った。そして、このスクリーニングで同定された TBC タンパク質の一つ (TBC1D10A/EPI64、以下 EPI64 と表記) が、実際に Rab27A を不活性化していることを明らかにし、Rab27A の GAP を世界で初めて同定することに成功した⁴⁾。

ヒトを含むほ乳類では EPI64 と極めて相同性の高いタ



Analysis of melanosome transport mechanism by small GTPase Rab27A

Takashi Ito

Department of Developmental Biology and Neurosciences, Graduated School of Life Sciences, Tohoku University

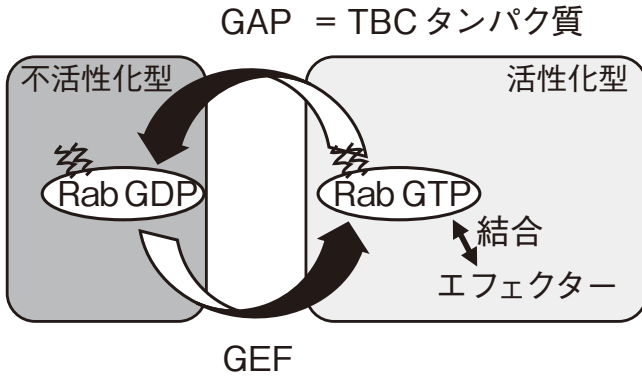


図1 Rab の機能メカニズムと活性サイクル

Rab の活性化サイクルをその制御因子を含めて示した。多くの低分子量 G 蛋白質に共通するメカニズムであるが、Rab は GTP 型と GDP 型をサイクルする事で膜輸送を制御している。GEF によって活性化した Rab はエフェクターと結合する事により機能を果たす。機能を果たした Rab は適切なタイミングで GAP により不活性化を受ける。現在、Rab-GAP は TBC タンパク質によって担われていると考えられている。

ンパク質 TBC1D10B/FLJ13130 (以下 FLJ13130 と表記)、TBC1D10C/mFLJ00332 (以下 mFLJ00332 と表記) が存在し、TBC1D10 ファミリーを形成している (図2)。この3者は TBC ドメインにおいて非常に高い相同性を持ち、全体の構造も良く似ているため、機能的な相関の可能性が示唆された。実際、筆者は FLJ13130 が Rab27A を不活性化し、メラノソーム輸送を負に制御していることを示している⁴⁾。しかしながら、最近他のグループから、複数の Rab に対して活性を持つ TBC タンパク質が報告されており⁵⁾、EPI64, FLJ13130, mFLJ00332 が Rab27A の不活性化という共通の機能のみならず、それぞれが更に個別の機能を持つという可能性が考えられた。そこで、TBC1D10

ファミリーのそれぞれのタンパク質に関して機能解析を行なった。それぞれ独立した仕事になっているが、興味深いデータが得られたので報告したい。

2. 実験

2. 1 免疫沈降

T7 タグや FLAG タグを融合した目的タンパク質を発現するベクターを構築、アカゲザル由来の COS-7 細胞に導入することでタンパク質を発現させた。細胞抽出液から、T7 タグを認識する抗体が付加されたアガロースビーズにより T7 タグ付きタンパク質を沈降させ、同時に FLAG タグ付きタンパク質が沈降してくるかどうかでタンパク質同士の結合の有無を評価した。

2. 2 細胞観察

EGFP や mRFP を融合した目的タンパク質を発現するベクターを構築、melan-a, PC12, Jurkat 細胞に導入した。細胞をパラフォルムアルデヒドで固定後、Rab3, Rab27 への特異的抗体で染色を行ない、共焦点顕微鏡にて観察を行なった。

2. 3 in vitro GAP assay

大腸菌用発現ベクターに Rab 遺伝子を導入したベクターを構築。Rab タンパク質を大腸菌から精製して用いた。TBC タンパク質は COS-7 細胞に発現させたものを精製して用いた。Rab タンパク質に放射性ラベルされた GTP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP) を結合させ、その後 TBC タンパク質と反応させた。反応後の GTP/GDP の量比を TLC 展開を行なうことで定量し、GAP 活性の有無を評価した。

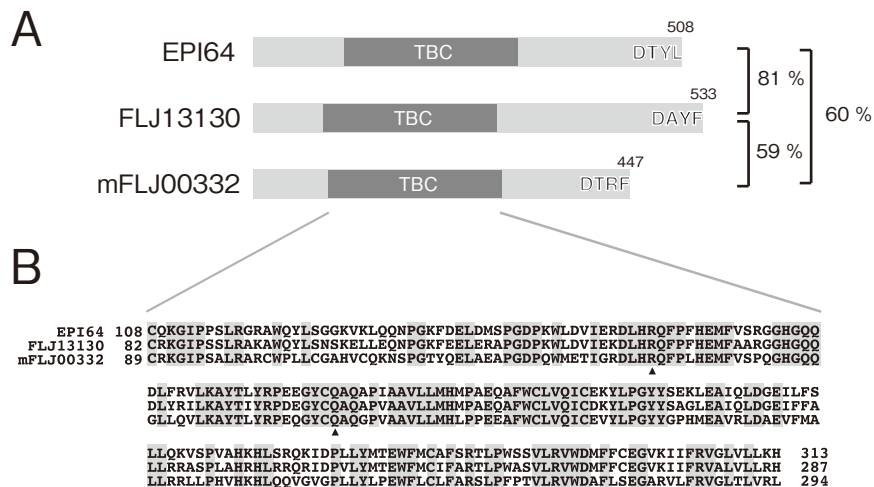


図2 TBC1D10 ファミリーの構造と配列の比較

- A. それぞれのタンパク質の構造と同一のアミノ酸の割合を示している。
- B. TBC ドメインの配列のアライメント。活性中心であることが明らかになっているアルギニンとグルタミンを矢印で示してある。

3. 結果

3. 1 TBC1D10A/EPI64

メラノソームの核周辺への凝集という Rab27A の機能不全による表現型を指標に、TBC タンパク質の中で Rab27A を不活性化するものを探索した結果、EPI64、FLJ13130 を含む 5 種類の TBC タンパク質の過剰発現によってメラノソームの凝集が引き起こされた (図 3 A)。この中から実際に Rab27A に活性を示すものを明らかにするために、共発現させた時に活性化型の Rab27A の量を減少させるものを調べてみると、EPI64 と FLJ13130 を共発現している時のみ活性化型 Rab27A の量が顕著に減少していることが明らかになった。実際、EPI64 と FLJ13130 を用いて *in vitro* GAP assay を行なうと *in vitro* においても EPI64 と FLJ13130 は Rab27A に GAP 活性を示した

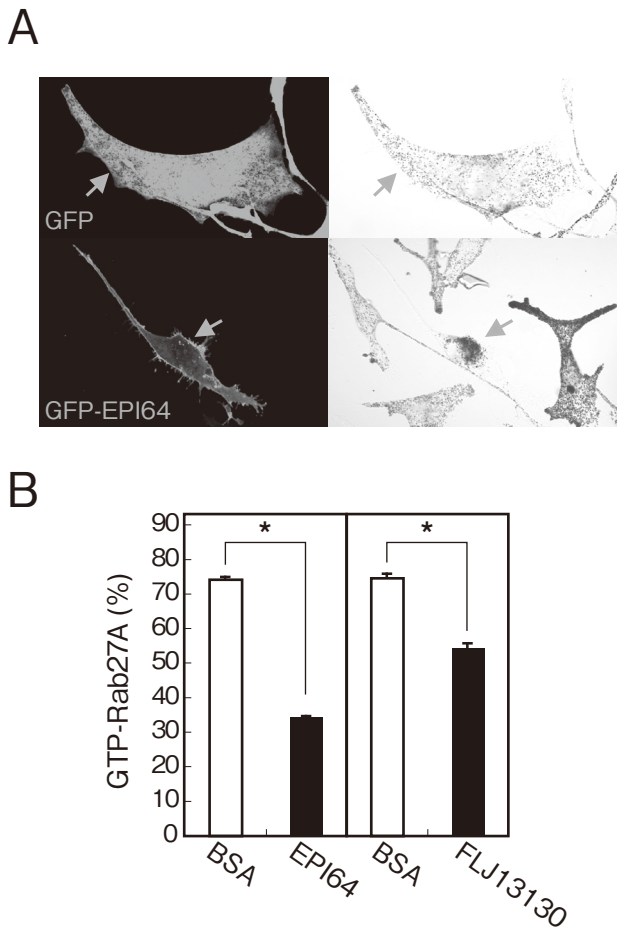


図3 TBC1D10A/EPI64

- A. GFP (上) もしくは GFP-EPI64 (下) を発現させた melan-a 細胞を示している。GFP を発現させた細胞では何も発現させていない細胞と同様に、メラノソームは細胞辺縁部に輸送されているが、GFP-EPI64 を発現した細胞では核周辺に凝集しているメラノソームが観察される。
- B. *In vitro* GAP assay の結果。コントロール (白) に対し、TBC タンパク質を加えることで (黒) GTP 型の Rab の量がどのように変化するかを調べている。EPI64 と FLJ13130 は Rab27A に GAP 活性を示した。

(図 3 B)。これらのデータは、過剰発現された EPI64 と FLJ13130 は Rab27A を不活性化する事によってメラノソーム凝集を引き起こしていると考えられる。EPI64 は実際に melan-a 細胞に発現していることが確認されたため、実際の細胞内での輸送にも EPI64 が機能している可能性は高いと考えている⁴⁾。

3. 2 TBC1D10B/FLJ13130

Rab3A は Rab27A と近縁の Rab であり、一次構造や局在などが他の Rab と比べて非常に似ている。しかしながら、Rab3A に関しては TBC タンパク質に属する GAP が同定されていなかった。そこで、EPI64 を同定したものと同様の手法を用いて、Rab3A に対する GAP の同定を試みた。副腎髄質クロマフィン細胞由来の PC12 細胞では、Rab3A は細胞突起先端の小胞上に局在し (図 4 A)、ホルモン分泌を制御している。Rab3A に活性を持つ TBC タンパク質を過剰発現させることで、この Rab3A の局在が失われるものがあれば、その TBC タンパク質は Rab3A の GAP であると考えられる。実際にスクリーニングを行なった結果、FLJ13130 の発現により Rab3A の局在が失われることが明らかになった (図 4 A)。興味深いことに mFLJ00332 は若干の活性を持つものの、EPI64 の発現では Rab3A の局在は全く影響を受けなかった (図 4 A)。*In vitro* GAP assay の結果、FLJ13130 は弱いものの Rab3A への GAP 活性を示した (図 4 B)。しかしながら他の Rab (Rab22A、Rab27A、Rab35) にも活性を示し、上記したように Rab27A への活性がもっとも強かった。FLJ13130 は EPI64 や mFLJ00332 (後述) と異なり、かなり緩い特異性を持った酵素であると考えられ、更に色素細胞とは異なる細胞でも機能していることが示唆された⁶⁾。

3. 3 TBC1D10C/mFLJ00332

ヒトを病気から守る免疫システムのなかで、T 細胞と抗原提示細胞とが形成する免疫シナプスは T 細胞が抗原を認識する過程で重要な役割を果たしている。この免疫シナプスを形成するためには極性に従った膜輸送が必要となるが、それに関わる Rab や Rab-GAP はまだ同定されていなかった。mFLJ00332 は末梢血 T 細胞に豊富に発現しており、その候補と考えられた。また、mFLJ00332 の標的を同定するため、mFLJ00332 と共局在を示す Rab を探索したところ、Rab35 がもっとも強く共局在する Rab だと同定され、実際、mFLJ00332 が Rab35 に GAP 活性を持つことを明らかにすることが出来た。またこの時、mFLJ00332 は Rab3A や Rab27A には GAP 活性を示さなかった (図 5)。更に、mFLJ00332 やドミナントネガティブ型の Rab35 の発現や mFLJ00332 のノックダウンによって、免疫シナプスの形成が著しく阻害され、同時に、リサ

イクリング経路の機能障害、極性を持った TCR (T Cell Receptor) の輸送に異常を示したことなどから、Rab35 と mFLJ00332 は T 細胞においてリサイクリング経路を制御することで免疫シナプスの形成に寄与していると考えられた⁷⁾。

4. 考察

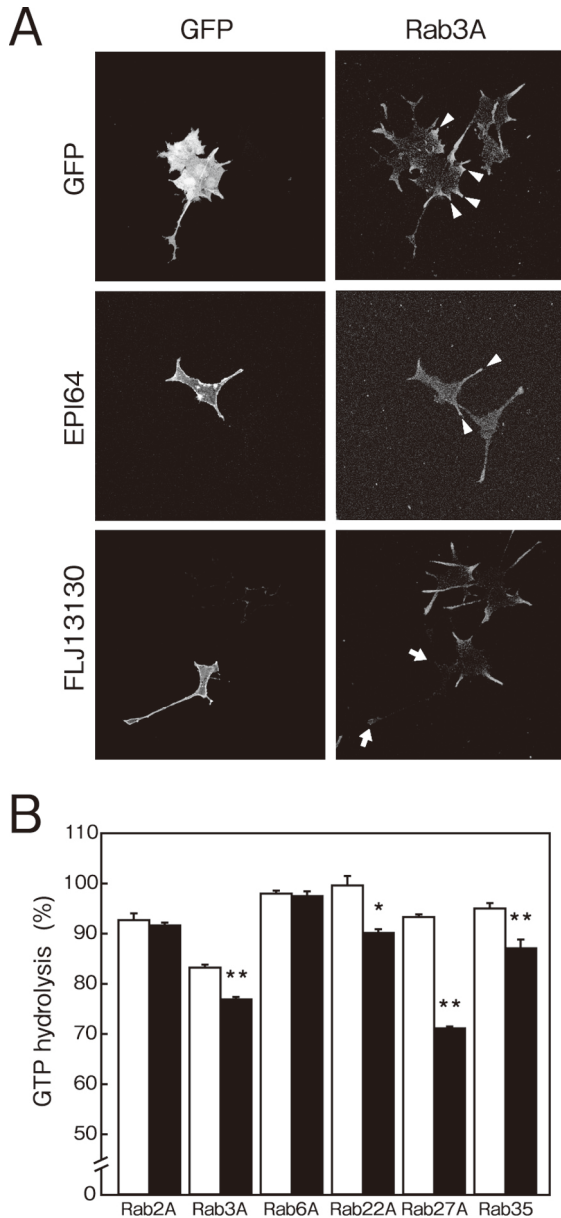


図4 TBC1D10B/FLJ13130

- A. GFP (上)、GFP-EPI64 (中)、GFP-FLJ13130 (下) を発現させた PC12 細胞を示している。細胞は固定後、抗 Rab3A 抗体を用いて染色している。GFP もしくは GFP-EPI64 が発現している細胞では、Rab3A の突起先端における局在は影響を受けていないが (矢頭)、GFP-FLJ13130 が発現している細胞では、突起先端の Rab3A のシグナルが有為に減少していることが観察される (矢印)。
- B. In vitro GAP assay の結果。コントロール (白) に対し、TBC タンパク質を加えることで (黒) GTP 型の Rab の量がどのように変化するかを調べている。FLJ13130 は複数の Rab に対し GAP 活性を示した。

以上のデータから TBC1D10 ファミリーのメンバーがそれぞれに固有の機能を持つということが示された。

T 細胞で機能することが明らかになった mFLJ00332 は、Rab27A に GAP 活性を持たなかったが、実際、mFLJ00332 を Melan-a 細胞に発現させてもメラノソームの凝集は起こらず、EPI64 と機能的に離れていることが示唆された。一方、FLJ13130 は EPI64 と同様メラノソーム輸送にも関与するが、ホルモン分泌を制御する Rab3A の局在の制御という EPI64 には無い機能も持つことが明らかになった (図 6 A)。構造の極めて良く似た TBC タンパク質間でこのような機能のバリエーションが存在することは想像しておらず、非常に驚く結果となった。

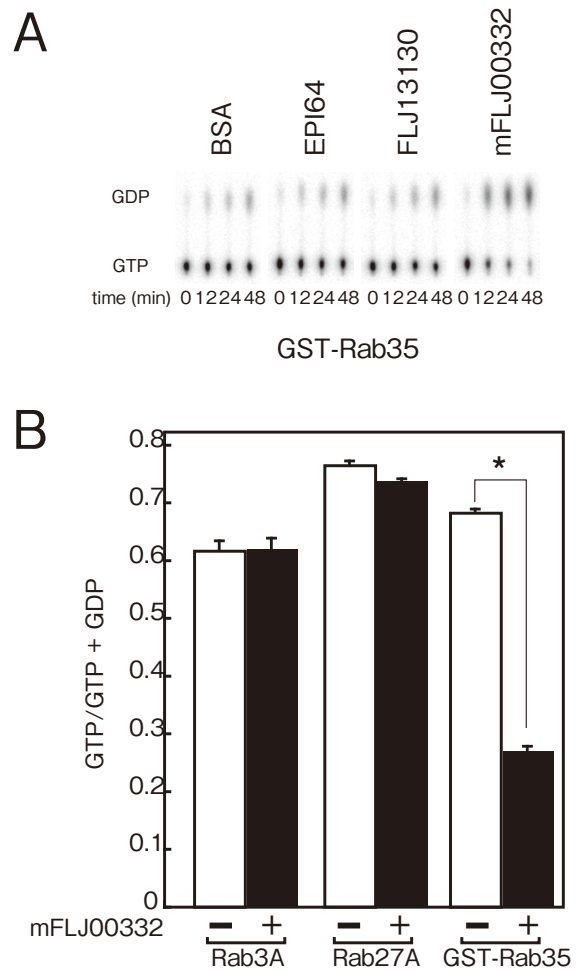


図5 TBC1D10C/mFLJ00332

- A. Rab35 に結合していたグアニンヌクレオチドを TLC 展開したものの。下のドットが GTP、上のドットが GDP の量を示している。時間経過とともに GDP の量が増えて行くが、mFLJ00332 が存在している場合の方がその速度が速い。つまり、mFLJ00332 は Rab35 に対して GAP 活性を示している。
- B. In vitro GAP assay の結果。コントロール (白) に対し、TBC タンパク質を加えることで (黒) GTP 型の Rab の量がどのように変化するかを調べている。mFLJ13130 は Rab3A, Rab27A には GAP 活性を示さなかった。

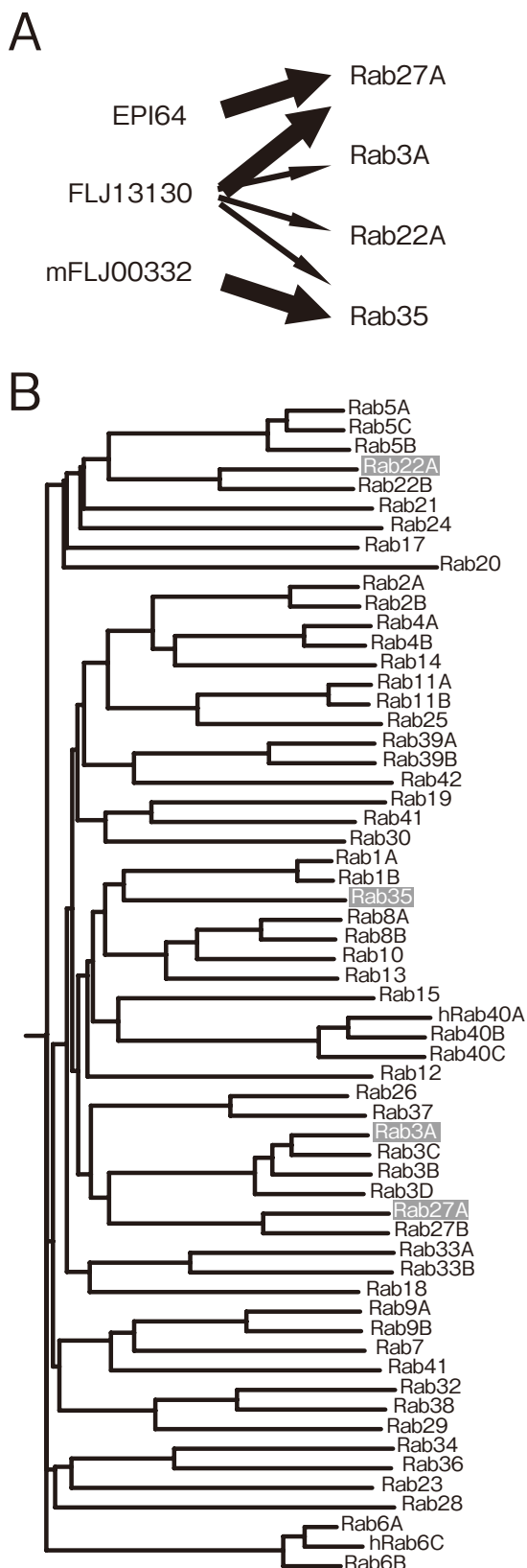


図6 まとめ

- A. TBC1D10 ファミリーと Rab の関係図。EPI64 と mFLJ00332 は強い特異性を持つが、FLJ13130 は緩い特異性を示した。
 B. Rab の系統樹。Rab3A、Rab22A、Rab27A、Rab35 を反転して示してある。Rab3A と Rab27A は近縁だが、Rab22A、Rab35 はかなり離れたところに位置する。

この結果はどのようなことを意味しているのであろうか。上記した T 細胞や PC12 細胞、色素細胞での機能はかなりかけ離れているため、TBC1D10 ファミリーがどのように機能分化してきたのかは現在のところ全く明らかでない。しかし、想像の域を出ないが、以下のようなモデルも考えられるのでないだろうか。Rab3A、Rab27A は色素細胞では細胞膜付近のメラノソームに局在するが、神経細胞ではシナプス小胞、特に細胞膜直下で放出を待つ小胞に局在している。Rab22A は細胞膜からエンドサイトーシスにより形成されるリサイクリングエンドソームに局在することが明らかになっている。Rab35 は数多く存在する Rab の中で唯一細胞膜に局在するという特徴を持つ。アミノ酸配列上はかなり異なる Rab 達であるが、細胞膜付近で機能するという共通項が存在する。TBC1D10 ファミリーは細胞膜付近の Rab を不活性化するように進化してきており、その後それぞれの Rab への特異性を獲得したのかもしれない。

Rab3A、Rab27A は Rab の中でも非常に配列も似ているが、Rab22A や Rab35 に関しては離れたサブファミリーに属している (図 6 B)。TBC ドメインの配列によって分類された TBC1D10 ファミリーのメンバーがこれほど広い範囲の Rab に対して活性を示すのは生化学的観点から非常に興味深く、TBC ドメインにおけるわずかな塩基の違いが、その基質特異性に大きな違いをもたらしている可能性がある。TBC ドメイン-Rab 複合体の立体構造を解き明かすことでその基質認識への普遍的なメカニズムが明らかになるかもしれない。

5. 総括

本研究成果のコスメトロジーへの応用の一つは、EPI64 を標的とした創薬であろう。EPI64 を活性化することで、メラノソームの輸送を阻害し、美白へとつなげることが出来る。EPI64 を標的にするような薬剤の作成を行なう場合、極めて相同性の高い分子である FLJ13130 や mFLJ00332 の機能を同様に活性化、または不活性化する可能性が十分に考えられる。今回示したデータの通り、FLJ13130 や mFLJ00332 は EPI64 にはない Rab3A、Rab35 を標的とするような機能を持つ。そのため、FLJ13130 や mFLJ00332 の活性に影響を与えないと言うセカンドスクリーニングを行なう事によって、事前に副作用の危険性を回避することが出来るようになるのではないだろうか。本研究がコスメトロジーに応用されることを期待したい。

(参考文献)

- 1) Raposo, G. and Marks, M. S. : Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 786-797, 2007

- 2) Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., et al. : Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome, *Nat. Genet.*, 25, 173-176, 2000
- 3) Wilson, S. M., Yip, R., Swing, D. A., et al. : A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7933-7938, 2000
- 4) Itoh, T., and Fukuda, M. : Identification of EPI64 as a GTPase-activating Protein Specific for Rab27A, *J. Biol. Chem.*, 281, 31823-31831, 2006
- 5) Miinea, C. P., Sano, H., Kane, S., et al. : AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain, *Biochem. J.*, 391, 87-93, 2005
- 6) Ishibashi, K., Kanno, E., Itoh, T., et al. : Identification and characterization of a novel Tre-2/Bub2/Cdc16 (TBC) protein that possesses Rab3A-GAP activity, *Genes Cells*, 14, 41-52, 2008
- 7) Genaro Patino-Lopez, Xiaoyun Dong, Khadija Ben-Aissa, et al. : Rab35 and Its GAP EPI64C in T Cells Regulate Receptor Recycling and Immunological Synapse Formation, *J. Biol. Chem.*, 283, 18323-18330, 2008