

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19H03181  
研究課題名（和文）多彩なRabエフェクター分子群によるポストゴルジ輸送経路制御機構の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive study on the post-Golgi trafficking pathway, mediated by diverse Rab family proteins

研究代表者  
吉村 信一郎（Yoshimura, Shin-ichiro）  
大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60584521  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類に存在する約60種類のRabの半数以上はゴルジ体以降の後期輸送経路に分布している。本研究ではそれらのRabとその結合分子であるエフェクタータンパク質の網羅的同定を行い、さらに機能解析を行なった。Rab6と結合するOxr1及びNcoa7はゴルジ体及びトランスゴルジネットワーク（TGN）においてV-ATPaseを抑制的に制御することを明らかにした。またRab8の結合タンパクであるEHBP1L1については、一次繊毛形成初期に形成される繊毛小胞に局在し、そのEHBP1L1結合分子であるCD2APとCIN85を介してアクチン重合を促進し、その結果繊毛長を抑制的に制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
我々は本研究の成果を世界に先駆けて論文として発表済み、あるいは発表予定であり、その点ではコミュニティーへの貢献は大きいと考えている。また我々が同定したRab結合分子の一部は疾患の原因となることが明らかになっており、本研究により当該疾患の理解が深まることが期待されることからその点でも社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：More than half of 60 Rab proteins which are encoded by the mammalian genome, localize at the post-Golgi compartment. In this study, we identified and analyzed post-Golgi Rab-binding effector proteins. We revealed that Rab6 and its novel binding proteins, Oxr1 and Ncoa7 localize on Golgi apparatus and trans-Golgi network (TGN) and negatively regulate V-ATPase activity. In addition, we found that Rab8 and its binding effector, EHBP1L1 localize on ciliary vesicle, which appears in early primary ciliogenesis. We also showed that EHBP1L1 cooperates with its binding proteins, CD2AP and CIN85, promote actin polymerization resulting in shortening the length of primary cilia.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Rab ゴルジ体 トランスゴルジネットワーク 一次繊毛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低分子量 G タンパク質である Rab は真核生物に高度に保存された細胞内膜輸送の主要な制御因子の一つとして知られている。Rab の活性は GTPase 活性化因子 (GAP) 及び GDP/GTP 交換因子 (GEF) によって厳密に制御されている。GTP が結合した活性化 Rab は種々のエフェクターを膜上に呼び込み、エフェクターを介して輸送を制御する。いわばエフェクターは膜輸送制御の実行分子であり、その同定と厳密な解析を経ずして Rab が仲介する細胞内輸送の全貌は明らかにすることはできない。当時までに同定されたエフェクターは全体の中で極一部だと思われるしており、多様な種類と機能を有するエフェクターが網羅されているとは言い難い状況であった。

我々はこれまで Rab の調節因子 (GAP、GEF) や Rab のエフェクターの一部について研究を行ってきたが (J. Cell Biol. 212: 297-306, 2016, J. Cell Biol. 217: 1777-1796, 2018) 我々独自の法論により当該分野の進展に貢献できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

哺乳類に存在する約 60 種類の Rab の半数以上はゴルジ体以降の後期輸送経路に分布している。近年の我々のエフェクターに関する研究を通じて、「Rab の機能とは？」という問いに一義的に答え難いことに気がついた。例えば Rab のノックダウンやノックアウト、Rab のドミナントネガティブ変異体を細胞に導入する等により Rab そのものを調べて、それらが細胞内小器官間どの経路を制御しているかを大まかに明らかにすることは出来ても、Rab が関わる膜輸送の素過程には迫れない。何故ならば、Rab の細胞内膜輸送に対する役割は常に多種多様な実行分子、エフェクターを介して果たされるからである。現在でさえそれぞれのエフェクターの機能が果たしてどれだけ詳細に調べられているだろうか？また、果たして現在同定されているエフェクターだけで Rab とそれが関る輸送経路の全てを説明できるであろうか？

そのような疑問から、本研究では Rab が関わる輸送機構の詳細な機構を明らかにすべく、特に膜輸送システムの中でも曖昧な解析に終始している哺乳動物細胞のポストゴルジの輸送経路に焦点を絞って、そこに存在する Rab のエフェクター分子並びにエフェクター分子への結合分子の探索、そしてそれらの解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) GST-pull down によるエフェクタータンパク質の同定

大腸菌由来の組換え GST 融合 Rab タンパク質を用いて各種組織、培養細胞抽出液に対し GST-pull down 法を行った。まず GST 融合 Rab タンパク質を精製し、グアニンヌクレオチド (GN) の結合能力を測定した。精製した Rab タンパク質 26 種類のうち 10 種類については良好な GN 結合能力が確認されたのでそれらについてはマウス脳、肝臓、腎臓組織由来、培養細胞についてはヒト RPE-1、HEK293、MNT-1、マウス EpH4 細胞由来の抽出液に対して pull down アッセイを行った。

GN の結合能力が弱かった、あるいは全く確認されなかった Rab に関しては BioID (近位依存

性ビオチン標識)を用いた pull down アッセイを行った。具体的には Rab タンパク質 にビオチンリガーゼを融合したものを HEK293Flpin 細胞に安定に発現させて、相互作用するタンパク質をビオチン化させる。ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンビーズで回収し、質量分析で同定した。また酵母ツーハイブリッド法による結合分子の同定も並行して行った。

#### (2) GST-pull down によるエフェクタータンパク質の同定

得られたエフェクタータンパク質に関して、さらに GST-pull down や免疫共沈降反応などによりエフェクターに結合するタンパク質を同定した。それらを siRNA による RNA 干渉法や CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトによりその発現を抑制し、後期分泌経路の細胞内小器官の形態変化や、各種モデル積荷タンパク質を用いた輸送アッセイにより、Rab とそのエフェクター複合体の膜輸送の素過程に迫った。

### 4. 研究成果

(1) 大腸菌より GST-Rab6 を精製し、GN 結合活性を調べた。我々が調べた Rab の中で Rab6 は一番 GN 結合能が高かった。このタンパク質とマウス脳抽出液を用いて、GST-pull down を行った。本実験では既知の結合分子が多数得られたのに加えて、それまでほとんど未解析であった

Oxr1 タンパク質を同定した(図1)。Oxr1 とそのパラログである Ncoa7 は哺乳類に存在する5種類の TLDCドメインを保有するタンパク質の内の2種類である。

Oxr1 に対する特異的抗体を作製し、その抗体を用いて免疫共沈降反応を行った結果、V-ATPase の触媒(A)サブユニットを同定した。V-ATPase はポストゴルジの細胞内小器官内腔の酸性化に寄与するプロトンポンプである。GST-pull down により Oxr1 及び Ncoa7 は TLDCドメインを介して A サブユニットと結合することを明らかにした。さらに精製タンパク質を用いた酵素化学的実験により、Oxr1 及び Ncoa7 が V-ATPase の ATP 加水分解能を抑制することを明らかにした(図2)。

次に間接蛍光抗体法により Oxr1 と Ncoa7 が、主にゴルジ体、及びトランスゴルジネットワーク(TGN)に局在することが明らかになったことから、Oxr1 及び Ncoa7 をノックアウト/ノックダウンした細胞におけるゴルジ体/TGN 内腔の pH を pHluorin を用いて測定したところ、有意な pH の低下が確認された(図3)。またゴルジ体/TGN 内腔の pH 環境に大きく左右されることが知られている糖鎖修飾酵素群の活性をレクチンプロット

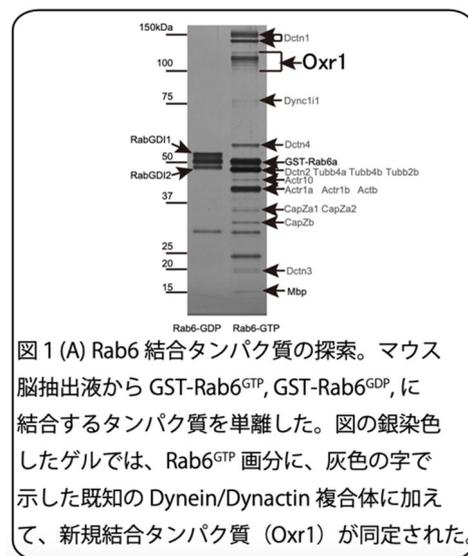


図1(A) Rab6 結合タンパク質の探索。マウス脳抽出液から GST-Rab6<sup>GTP</sup>, GST-Rab6<sup>GDP</sup>, に結合するタンパク質を単離した。図の銀染色したゲルでは、Rab6<sup>GTP</sup> 画分に、灰色の字で示した既知の Dynein/Dynactin 複合体に加えて、新規結合タンパク質 (Oxr1) が同定された。

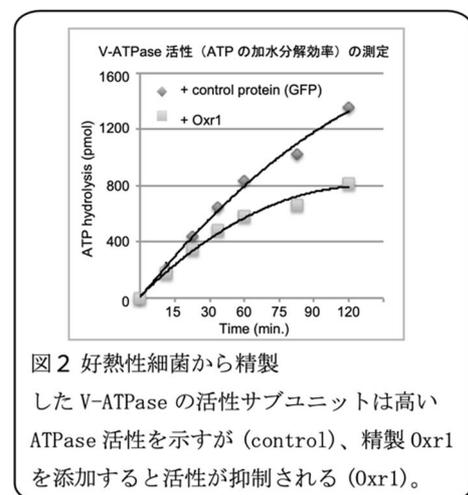


図2 好熱性細菌から精製した V-ATPase の活性サブユニットは高い ATPase 活性を示すが (control)、精製 Oxr1 を添加すると活性が抑制される (Oxr1)。

で確認したと、Oxr1 及び Ncoa7 をノックアウト/ノックダウンした細胞では糖鎖修飾に部分的な阻害の効果が確認された。

以上のことを総括すると、本研究は小器官内腔の pH 環境を細胞質因子である Rab がエフェクターを介して制御するという全く新しい発見に至ったと言える。

(2) 酵母ツーハイブリッド法によって同定した Rab8 のエフェクターである EHBP1L1 は、Rab8 のみならず、Rab8 サブファミリーのメンバーである Ra10 や Rab13 と

も結合することが明らかになっている。Rab8 サブファミリーは上皮細胞や有繊毛細胞、神経細胞において極性輸送を司る Rab の一群であり、本研究では EHBP1L1 タンパク質の一次繊毛形成への役割について焦点を絞った解析を行なった。まず EHBP1L1 特異的抗体を用いた間接蛍光抗体法により、EHBP1L1 は一次繊毛形成初期に生じる繊毛小胞に局在することが明らかになり、またその後の成熟した一次繊毛にはほとんど観察されなかった(図4)。次に EHBP1L1 を siRNA によってノックダウンすると、一次繊毛の伸長が確認された。EHBP1L1 の新規結合分子を同定したところ、F-アクチン制御因子群のアダプターである CD2AP とそのパラログである CIN85 が得られた(図5)。それらの発現抑制をすると、EHBP1L1 の場合と同様に一次繊毛の伸長が見られた。さらに EHBP1L1、及び CD2AP/CIN85 発現抑制下では基底小体付近のアクチンの重合の低下が観察された。以上のことから、Rab-EHBP1L1-CD2AP/CIN85 は基底小体付近でアクチンの重合を制御することによって、一次繊毛長を制御することが明らかになった。

(3) そのほかの Rab 結合タンパク質もエフェクタータンパク質が種々得られている。現在解析を鋭意継続中である。

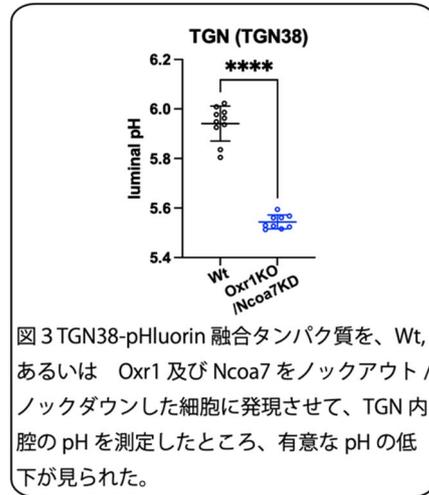


図3 TGN38-pHluorin 融合タンパク質を、Wt、あるいは Oxr1 及び Ncoa7 をノックアウト/ノックダウンした細胞に発現させて、TGN 内腔の pH を測定したところ、有意な pH の低下が見られた。

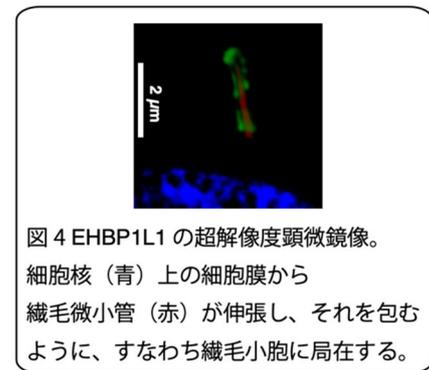


図4 EHBP1L1 の超解像度顕微鏡像。細胞核(青)上の細胞膜から繊毛微管(赤)が伸張し、それを包むように、すなわち繊毛小胞に局在する。

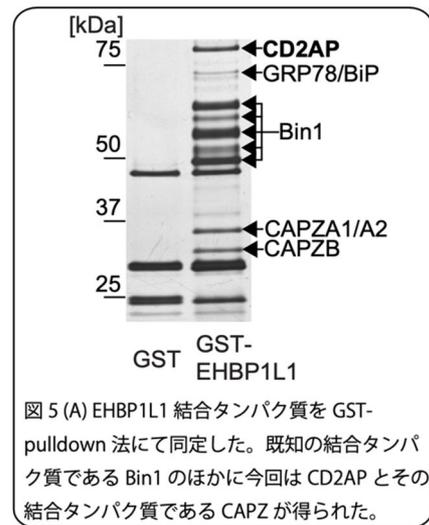


図5(A) EHBP1L1 結合タンパク質を GST-pulldown 法にて同定した。既知の結合タンパク質である Bin1 のほかに今回は CD2AP とその結合タンパク質である CAPZ が得られた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwano Tomohiko, Sobajima Tomoaki, Takeda Sen, Harada Akihiro, Yoshimura Shin-ichiro	4. 巻 299
2. 論文標題 The Rab GTPase-binding protein EHBP1L1 and its interactors CD2AP/CIN85 negatively regulate the length of primary cilia via actin remodeling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102985 ~ 102985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.102985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wu Ji, Moriwaki Kenta, Asuka Tatsuya, Nakai Ritsuko, Kanda Satoshi, Taniguchi Manabu, Sugiyama Tatsuki, Yoshimura Shin-ichiro, Kunii Masataka, Nagasawa Takashi, Hosen Naoki, Miyoshi Eiji, Harada Akihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 EHBP1L1, an apicobasal polarity regulator, is critical for nuclear polarization during enucleation of erythroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2022008930	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsujiyama K., Jo T., Nagira D., Konaka H., Park J. H., Yoshimura S., Ninomiya A., Sugihara F., Hirayama T., Itotagawa E., Matsuzaki Y., Takaichi Y., Aoki W., Saita S., Nakamura S., Ballabio A., Nada S., Okada M., Takamatsu H., Kumanogoh A.	4. 巻 42
2. 論文標題 The lysosomal Ragulator complex activates NLRP3 inflammasome via HDAC6	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022111389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Oe Yukako, Kakuda Keita, Yoshimura Shin-ichiro, Hara Naohiro, Hasegawa Junya, Terawaki Seigo, Kimura Yasuyoshi, Ikenaka Kensuke, Suetsugu Shiro, Mochizuki Hideki, Yoshimori Tamotsu, Nakamura Shuhei	4. 巻 18
2. 論文標題 PACSL1 is indispensable for amphisome-lysosome fusion during basal autophagy and subsets of selective autophagy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1010264	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Kunii, Yuria Noguchi, Shin-Ichiro Yoshimura, Satoshi Kanda, Tomohiko Iwano, Erda Avriyanti, Nur Atik, Takashi Sato, Ken Sato, Masaharu Ogawa, Akihiro Harada	4. 巻 220
2. 論文標題 SNAP23 deficiency causes severe brain dysplasia through the loss of radial glial cell polarity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of cell biology	6. 最初と最後の頁 1-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201910080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayano Iwaki, Kenta Moriwaki, Tomoaki Sobajima, Manabu Taniguchi, Shin-Ichiro Yoshimura, Masataka Kunii, Satoshi Kanda, Yoshihiro Kamada, Eiji Miyoshi, Akihiro Harada	4. 巻 34
2. 論文標題 Loss of Rab6a in the small intestine causes lipid accumulation and epithelial cell death from lactation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB journal	6. 最初と最後の頁 9450-9465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000028R	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉村信一郎 岩野智彦
2. 発表標題 EHBP1L1が一次繊毛形成に果たす役割
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村信一郎
2. 発表標題 Rab11新規結合分子RELCHによるエンドソーム-TGN間コレステロール輸送の制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	岩野 智彦  (Iwano Tomohiko)  (10442930)	山梨大学・大学院総合研究部・講師    (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------