

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03220

研究課題名(和文) ゴルジ体における可溶性分泌蛋白質の新規選別機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel sorting mechanism of soluble secretory proteins in the Golgi

研究代表者

福田 光則 (Fukuda, Mitsunori)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：50311361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体で合成された可溶性の分泌蛋白質や膜蛋白質は、輸送小胞に積み込まれ、ゴルジ体経由で細胞膜へと輸送される。小胞体から積み荷を含む小胞が出芽する際には、可溶性蛋白質と膜蛋白質は同じ輸送小胞に選別されており、ゴルジ体からの出芽の際にも同様な仕組みが用いられると広く考えられている。しかし、ゴルジ体から出芽する可溶性蛋白質と膜蛋白質の小胞が本当に同一であるかは明らかではなく、それらの選別・輸送の仕組みについては不明な点が多かった。本研究では、Rab6やその結合分子が可溶性蛋白質の分泌に重要な役割を果たすことを明らかにし、ゴルジ体における可溶性蛋白質の選別・輸送機構の一端を解明することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、可溶性蛋白質と膜蛋白質は必ずしも同じ輸送小胞に選別されるのではなく、少なくともRab6非存在下では、両者が異なる小胞に選別されている可能性が極めて高いことが明らかになった。今後、Rab6に依存しない膜蛋白質の輸送の詳細な仕組みが明らかになれば、教科書の記載変更にもつながるものと期待される。

また、我々の体を構成する細胞は、コラーゲンなど生理学的に重要な様々な可溶性蛋白質を細胞外へと放出している。本研究により明らかになったRab6とその結合分子を介する分泌の詳細な分子基盤が明らかになれば、将来的には、薬剤スクリーニング等による人為的な分泌制御にも発展する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In the secretory pathway, soluble secretory proteins and membrane proteins are packed into small vesicles, which are transported from the endoplasmic reticulum (ER), to the Golgi apparatus, and eventually to the plasma membrane. In general, soluble secretory proteins and membrane proteins are packed into the "same transport vesicles" in the ER, and a similar mechanism is thought to be used when both proteins are sorted into transport vesicles even in the Golgi, although their sorting and transport mechanisms are poorly understood. In this study, we found that Rab6 plays an important role in secretion of soluble secretory proteins. In Rab6-knockout cells, secretion of soluble secretory proteins to the culture medium was generally impaired, whereas transport of transmembrane proteins to the plasma membrane was only mildly affected. Based on our findings, we suggest that soluble secretory proteins and transmembrane proteins are mostly segregated into different post-Golgi vesicles.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低分子量Gタンパク質 Rab 分泌経路 上皮細胞 Rab panel スクリーニング ノックアウト細胞 可溶性蛋白質 膜輸送

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

分泌経路とは、小胞体で合成された可溶性の分泌蛋白質（以下、可溶性蛋白質と略）や膜蛋白質を輸送小胞に包み込み、ゴルジ体経由で細胞膜へと輸送する代表的な小胞輸送（膜輸送）の経路である。一般的に、小胞体から積み荷を含む小胞が出芽する際には、可溶性蛋白質と膜蛋白質は同じ輸送小胞に選別されており、ゴルジ体からの出芽の際にも同様な仕組みが用いられると広く考えられている。しかし、ゴルジ体から出芽する可溶性蛋白質の小胞と膜蛋白質の小胞が完全に一致しているかは、実はこれまで実験的には証明されていなかった。

この分泌経路を含む様々な膜輸送の経路の制御には、酵母からヒトを含む高等多細胞生物に至るまで、進化的に保存された一群の蛋白質の関与が知られている。中でも、低分子量 G 蛋白質・Rab ファミリーは膜輸送の制御において、中心的な役割を担うと考えられている。これまで幾つかの Rab の分泌経路への関与が報告されているものの、可溶性蛋白質と膜蛋白質の輸送の違いに着目した研究は行われておらず、Rab によるこれら二種類の蛋白質の選別・輸送の制御機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、イヌ腎臓上皮細胞由来の MDCK 細胞を用いて、哺乳類に共通して存在する 58 種類全ての Rab のノックアウト (KO) 細胞株あるいは条件付き KO 細胞株を樹立し、これらの KO 細胞株の網羅的な機能解析を通して、分泌経路における可溶性蛋白質と膜蛋白質の選別・輸送機構の違いを明らかにすることを目指した。また、樹立した Rab の KO 細胞株の機能解析も進め、Rab の新たな機能解明にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 哺乳類に共通して存在する 58 種類の Rab を対象に、CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術を用いて MDCK 細胞で KO 細胞株を樹立した。尚、同等の機能を有すると考えられるパラログの Rab (例えば、Rab6A と Rab6B 等) については全て同時に KO を行った (以下、Rab6 KO と記載)。また、細胞の生存・増殖に必須の Rab1 及び Rab5 については、通常的手法では KO 細胞株が得られないため、オーキシシン-デグロン法を組み合わせることで、条件付き KO 細胞株を樹立した。

(2) 分泌経路を可視化し、時空間的に解析するため、可溶性蛋白質のモデルとしてシグナル配列 (ss) を付加した成熟時間の短い super-folder GFP [ss-sfGFP] と膜蛋白質のモデルとして ss-sfGFP-TM (C 末端側に膜貫通領域を結合) を作製した。また、分泌経路に沿った輸送を同調化するため、薬剤によりオリゴマー化を人為的に制御できる FM4 ドメインをモデル分子に挿入した (例えば、ss-sfGFP-FM4)。この FM4 を持つモデル分子は、定常状態では小胞体に蓄積するが、薬剤添加によりオリゴマー化を解除すると、分泌経路に沿った輸送が同調的に開始される。これらのモデル分子を KO 細胞株に導入し、分泌経路への影響を検討した。

(3) 分泌経路に影響の見られた Rab-KO 細胞株については、適切に輸送されなかったモデル分子が細胞内のどこに蓄積しているのかを、各種オルガネラマーカーとの共免疫染色により検討した。

(4) 得られた候補 Rab については、Rab による分泌経路の制御基盤を明らかにするため、共に働くエフェクター (結合) 分子の探索を行った。具体的には、Rab エフェクター候補分子の KO 細胞株を樹立し、候補 Rab の KO と表現型が同じになるものを探索した。

4. 研究成果

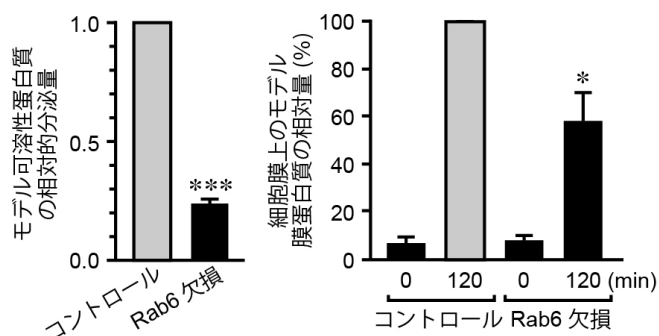
(1) 樹立した Rab の KO 細胞株とモデル分泌蛋白質・膜蛋白質を用いて網羅的な機能解析を行い、Rab6 を欠損すると、膜蛋白質の細胞膜局在にはほとんど影響はみられないが (細胞膜への輸送の遅延: 図 1 右)、可溶性蛋白質の分泌のみが著しく低下していることを見出した (図 1 左)。

図 1 Rab6 欠損 (KO) 細胞における可溶性蛋白質の分泌阻害

(左) 野生型 (コントロール) と Rab6 欠損細胞におけるモデル可溶性蛋白質の相対的分泌量を示す。

(右) 野生型 (コントロール) と Rab6 欠損細胞におけるモデル膜蛋白質の相対的分泌量を示す。

*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$

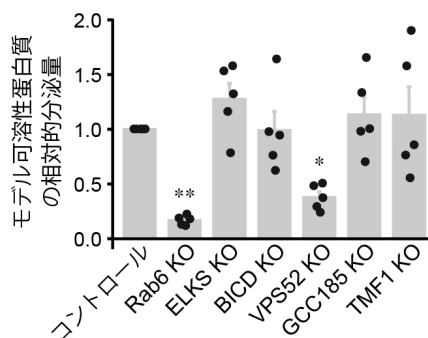


このため、Rab6 の KO 細胞では細胞外マトリックスの成分がほとんど側底膜側に分泌されておらず、上皮組織の機能に重要な基底膜が形成できないことを突き止めた (文献①)。

(2) Rab6 がどのような仕組みでゴルジ体での可溶性蛋白質の輸送・選別を制御するかを明らかにするため、候補と考えられる 5 種類の Rab6 エフェクター (結合) 分子の KO 細胞株を樹立した。これらの KO 細胞株を用いて、Rab6 欠損と同じ症状 (可溶性蛋白質の分泌不全とリソソームへの蓄積、及び基底膜形成不全) を示すものがないか解析を行った。その結果、VPS52 の KO のみ、可溶性蛋白質の分泌不全とリソソームへの蓄積が再現されたが、基底膜の形成には影響が無かった。すなわち、Rab6 は VPS52 と共に可溶性蛋白質の分泌制御を行うが、基底膜形成においては、別の未知のエフェクター分子と結合して機能する可能性が示唆された (図 2) (文献②)。

図 2 VPS52 欠損 (KO) 細胞における可溶性蛋白質の分泌阻害

野生型 (コントロール)、Rab6 欠損、Rab6 エフェクター欠損細胞におけるモデル可溶性蛋白質の相対的分泌量を示す。5 種類の Rab6 エフェクター候補のうち、VPS52 欠損細胞でのみ、Rab6 欠損細胞と同じく、可溶性蛋白質の分泌量の低下が観察された。
*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$



(3) 膜蛋白質のモデル分子を発現する KO 細胞株を用いて、膜蛋白質の分泌経路を制御する新たな Rab の探索も行い、ゴルジ体から細胞膜への輸送に関わる新たな Rab の同定にも成功した。この分子を欠損する MDCK 細胞では、細胞膜に輸送されなかったモデル膜蛋白質が細胞内にドット状に蓄積することが明らかになった。従って、可溶性蛋白質と膜蛋白質の選別・輸送は、二種類の Rab により制御される可能性が強く示唆された。

(4) Rab1 の条件付き KO 細胞株を用いた分泌経路の解析から、Rab1 が可溶性蛋白質と膜蛋白質の小胞体からゴルジ体への輸送に必須であることを明らかにした。また、Rab1 が初期エンドソーム等の細胞内局在 (特に細胞辺縁部への輸送) に重要な役割を果たすという予想外の知見を得ることができた (文献③)。また、樹立した Rab の KO 細胞株のコレクションを用いて、国際共同研究等を実施し、シリア形成やエンドサイトーシス経路における Rab の新たな機能解明にも成功した (文献④~⑥)。

<引用文献>

- ① Homma, Y., Kinoshita, R., Kuchitsu, Y., Wawro, P. S., Marubashi, S., Oguchi, M. E., Ishida, M., Fujita, N. & Fukuda, M. (2019) Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 218, 2035-2050 doi: 10.1083/jcb.201810134
- ② Homma, Y. & Fukuda, M. (2021) Knockout analysis of Rab6 effector proteins revealed the role of VPS52 in the secretory pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 561, 151-157 doi: 10.1016/j.bbrc.2021.05.009
- ③ Hatoyama, Y., Homma, Y., Hiragi, S. & Fukuda, M. (2021) Establishment and analysis of conditional Rab1- and Rab5-knockout cells using the auxin-inducible degron system. *J. Cell Sci.* 134, jcs259184 doi: 10.1242/jcs.259184
- ④ Oguchi, M. E., Okuyama, K., Homma, Y. & Fukuda, M. (2020) A comprehensive analysis of Rab GTPases reveals a role for Rab34 in serum starvation-induced primary ciliogenesis. *J. Biol. Chem.* 295, 12674-12685 doi: 10.1074/jbc.RA119.012233
- ⑤ Ganga, A. K., Kennedy, M. C., Oguchi, M. E., Gray, S. D., Oliver, K. E., Knight, T. A., De La Cruz, E. M., Homma, Y., Fukuda, M. & Breslow, D. K. (2021) Rab34 GTPase mediates ciliary membrane formation in the intracellular ciliogenesis pathway. *Curr. Biol.* 31, 2895-2905 doi: 10.1016/j.cub.2021.04.075
- ⑥ Trofimenko, E., Homma, Y., Fukuda, M. & Widmann, C. (2021) The endocytic pathway taken by cationic substances requires Rab14 but not Rab5 and Rab7. *Cell Rep.* 37, 109945 doi: 10.1016/j.celrep.2021.109945

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計25件（うち査読付論文 24件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 20件）

1. 著者名 Oguchi Mai E., Okuyama Koki, Homma Yuta, Fukuda Mitsunori	4. 巻 295
2. 論文標題 A comprehensive analysis of Rab GTPases reveals a role for Rab34 in serum starvation-induced primary ciliogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12674 ~ 12685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012233	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 Matsui Takahide, Osaki Futaba, Hiragi Shu, Sakamaki Yuriko, Fukuda Mitsunori	4. 巻 22
2. 論文標題 ALIX and ceramide differentially control polarized small extracellular vesicle release from epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e51475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202051475	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 Homma Yuta, Hiragi Shu, Fukuda Mitsunori	4. 巻 288
2. 論文標題 Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 36 ~ 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15453	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 本間 悠太, 福田 光則	4. 巻 92
2. 論文標題 ノックアウト解析により加速する低分子量Gタンパク質Rabの生理機能の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 447 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920447	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 Homma, Y., Kinoshita, R., Kuchitsu, Y., Wawro, P. S., Marubashi, S., Oguchi, M. E., Ishida, M., Fujita, N. and Fukuda, M.	4. 巻 218
2. 論文標題 Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 2035-2050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201810134	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 Kinoshita, R., Homma, Y. and Fukuda, M.	4. 巻 295
2. 論文標題 Rab35-GEFs, DENND1A and folliculin differentially regulate podocalyxin trafficking in two- and three-dimensional epithelial cell cultures.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3652-3663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011646	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 Marubashi, S. and Fukuda, M.	4. 巻 45
2. 論文標題 Rab7B/42 is functionally involved in protein degradation on melanosomes in keratinocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Struct. Funct.	6. 最初と最後の頁 45-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.19039	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 Osaki Futaba, Matsui Takahide, Hiragi Shu, Homma Yuta, Fukuda Mitsunori	4. 巻 134
2. 論文標題 RBD11, a bioengineered Rab11-binding module for visualizing and analyzing endogenous Rab11	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs257311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.257311	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 Homma Yuta, Fukuda Mitsunori	4. 巻 561
2. 論文標題 Knockout analysis of Rab6 effector proteins revealed the role of VPS52 in the secretory pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 151 ~ 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.009	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 Ganga Anil Kumar, Kennedy Margaret C., Oguchi Mai E., Gray Shawn, Oliver Kendall E., Knight Tracy A., De La Cruz Enrique M., Homma Yuta, Fukuda Mitsunori, Breslow David K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Rab34 GTPase mediates ciliary membrane formation in the intracellular ciliogenesis pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2895 ~ 2905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.04.075	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 Trofimenko Evgeniya, Homma Yuta, Fukuda Mitsunori, Widmann Christian	4. 巻 37
2. 論文標題 The endocytic pathway taken by cationic substances requires Rab14 but not Rab5 and Rab7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109945 ~ 109945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109945	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 該当する

1. 著者名 Hatoyama Yuki, Homma Yuta, Hiragi Shu, Fukuda Mitsunori	4. 巻 134
2. 論文標題 Establishment and analysis of conditional Rab1- and Rab5-knockout cells using the auxin-inducible degron system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259184	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 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 福田光則
2. 発表標題 上皮細胞におけるALIXとセラミドを介したエクソソームの極性分泌の制御機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会ワークショップ「オルガネラQC-細胞小器官の量と質の管理機構」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田光則
2. 発表標題 低分子量G蛋白質Rab～その出会いから網羅解析まで～
3. 学会等名 新学術研究領域「オルガネラゾーン」若手の会・教育講演（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田光則
2. 発表標題 上皮細胞における頂端膜、側底膜エクソソームの形成と放出機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会シンポジウム「膜のリモデリングと組織化の分子基盤」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsunori Fukuda
2. 発表標題 Mechanisms of polarized exosome release from epithelial cells.
3. 学会等名 The NIPS International Symposium “Frontiers in Epithelial Cell Biology”（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsunori Fukuda
2. 発表標題 Different types of exosomes are secreted from the apical and basolateral membranes of epithelial cells.
3. 学会等名 Pacifichem 2021 Congress “ Extracellular Fine Particle: Chemistry, Biology, and Biomedical Applications ” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院生命科学研究科膜輸送機構解析分野 https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail.html?id=1724 東北大学大学院生命科学研究科膜輸送機構解析分野 https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail.html?id=1724
--

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

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		
米国	University of California	Yale University	