

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00457

研究課題名(和文) プレエンプティブ品質管理を介した低分子量Gタンパク質の新しい制御機構とその意義

研究課題名(英文) Pre-emptive protein quality control machinery-mediated regulation of Rab8-family small GTPases

研究代表者

川原 裕之 (Kawahara, Hiroyuki)

東京都立大学・理学研究科・教授

研究者番号：70291151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、BAG6による分解ターゲティングが必須である低分子量Gタンパク質をモデルに、プレエンプティブ品質管理マシナリーが標的的低分子量Gタンパク質を峻別するメカニズムを解明した。Rab8タンパク質のGTPaseドメインに存在するSwitch 1領域が、BAG6ならびにユビキチンリガーゼRNF126との相互作用に必要で、これがGDP型特異的にRabタンパク質を不安定化を制御することがわかった (Takahashi et al., iScience 2023)。さらに低分子量Gタンパク質RhoAの分解制御機構の解明にも成功した(Miyauchi et al., 2023)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの細胞内には、物質輸送のネットワークが張り巡らされています。このシステムは、RabやRhoといった一群の低分子量Gタンパク質によって調節されていますが、これらタンパク質の活性や存在量がどのように規定されるかはわかっていませんでした。本研究により、プレエンプティブ品質管理と呼ばれるタンパク質分解マシナリーが、低分子量Gタンパク質Rab8a, Rab10, およびRhoAの安定性を制御していること、これらを介して細胞内物質輸送や細胞骨格の構築が守られていることを初めて明らかにしました。これらの成果は、アメリカ細胞生物学会誌などに掲載され、注目を集めています。

研究成果の概要(英文)：The small GTPase Rab8 plays a vital role in the vesicular trafficking of cargo proteins from the trans-Golgi network to target membranes. Upon reaching its target destination, Rab8 is released from the vesicular membrane into the cytoplasm. The fate of GDP-bound Rab8 released from the destination membranes, however, has not been investigated adequately. In this study, we found that GDP-bound Rab8 subfamily proteins are targeted for immediate degradation, and the pre-emptive quality control machinery is essential for eliminating these proteins in a nucleotide-specific manner. We provide evidence that components of this quality control machinery have a critical role in vesicular trafficking events, including the formation of primary cilia, a process regulated by the Rab8 subfamily. These results suggest that the protein degradation machinery plays a critical role in the integrity of membrane trafficking by limiting the excessive accumulation of GDP-bound Rab8 subfamily proteins.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：Protein quality control ubiquitin small GTPase BAG6 RNF126 Rab8 ciliogenesis proteasome

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

低分子量 G タンパク質は、GTP 型(活性)と GDP 型(不活性)をサイクルする。従来、低分子量 G タンパク質の活性制御は、ヌクレオチド交換因子(GEF)や GTPase 活性化タンパク質(GAP)を介した GTP-GDP 交換サイクルから説明されていた。一方、GAP や GEF を介したヌクレオチド交換サイクルのみでは、GTP 型への極端な平衡の偏りを説明することが困難であり、新しい次元での制御システム解明が、焦眉の課題となっていた。研究開始当初、これまでは極めて安定な膜タンパク質と考えられてきた低分子量 G タンパク質(Rab8a)が、GDP 型特異的に急速分解を受けることがわかっていた。一方、低分子量 G タンパク質の代謝的不安定性が、G タンパク質活性制御にどのように関わり得るのか、何によって安定性が規定されているのか、さらにこれがどのような生物学的意義を持っているのか、これら問いの全容は未だ明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

低分子量 G タンパク質の多くは、これまで極めて安定と考えられてきた。実際に、細胞内で大多数を占める GTP 結合型低分子量 G タンパク質は長い半減期を示す。そのため低分子量 G タンパク質の選択的分解に関連した知見は、ほとんど存在しなかった。一方、我々はプレエンパイヴ経路に依存的な、「GDP 型特異的」 Rab8a タンパク質の分解現象を見だし、この破綻が膜輸送を阻害することを突き止めた (*EMBO Rep.*, 2019)。

さらに、GDP 型 Rab8a のみならず、RhoA・CDC42 など多くの低分子量 G タンパク質群の量的調節因子として、BAG6 複合体を新しく見だしつつあった。

そこで本研究では、ヌクレオチド依存的な低分子量 G タンパク質群の選択的分解に初めて焦点を当て、その生物学的意義と識別メカニズムを解明することで、新しい細胞機能の制御機構を提案することに挑戦した。

### 3. 研究の方法

本研究では、BAG6 による分解ターゲティングが必須である低分子量 G タンパク質 (GDP 型 Rab8a, *EMBO Rep.* 2019) をモデルに、プレエンパイヴ品質管理マシナリーが標的 G タンパク質を峻別するメカニズムを解明する。具体的には、BAG6 抑圧下で低分子量 G タンパク質分解を司るユビキチン化酵素を同定し、低分子量 G タンパク質の

安定性決定のメカニズム解明を目指した。また、このシステムが破綻した場合の表現型を遺伝子抑圧系を開発することで検討した。

#### 4. 研究成果

本研究では、BAG6による分解ターゲットイングが必須である低分子量 G タンパク質をモデルに、プレエンブティヴ品質管理マシナリーが標的低分子量 G タンパク質を峻別するメカニズム解明に挑戦した。真核生物ゲノムにコードされた100種を超える低分子量 G タンパク質の GTPase ドメインは、互いに高いアミノ酸配列の相同性を示す。一方、これらと BAG6 との親和性には大きな差異が認められた。例えば、Rab8a や RhoA は強く BAG6 と相互作用する一方で、Rab7、Rac1 や Ran ファミリーは殆ど BAG6 との親和性を示さない。これら相互作用の差が、どのような生物学的意味を持っているかを意識して研究を進めた。

低分子量 G タンパク質 Rab8 の GTPase ドメインに存在する Switch I 領域が、BAG6 ならびにユビキチンリガーゼ RNF126 との相互作用に必要であること、更にこれが GDP 型特異的に Rab タンパク質を不安定化を制御することがわかった (Takahashi et al., iScience 2023)。RNF126 は BAG6 依存的に GDP 型 Rab8 に結合し、そのポリユビキチン化とプロテアソーム依存的分解を誘導する。BAG6 あるいは RNF126 のノックダウンを行うと、GDP 型 Rab8 は安定化し、小胞輸送の異常をもたらす。同時に、BAG6 の機能抑圧は一次繊毛の形成不全を誘導することを明らかにした (Takahashi et al., iScience 2023)。

BAG6 を介した低分子量 G タンパク質 Rab8 の機能調節は、糖取り込みチャネルタンパク質 GLUT4 の細胞内輸送をも制御する。BAG6 を機能阻害した細胞では、GLUT4 の細胞内輸送に欠損を示し、当該細胞の糖取り込み効率を低下させる (Minami et al., 2020)。このことは、BAG6 が糖尿病発症の過程に関与していることを示唆しており、BAG6 の遺伝子多形が糖尿病発症のリスクに関連するという文献と一致する。

低分子量 G タンパク質 RhoA の分解制御機構の解明にも成功した (Miyachi et al., 2023)。RhoA は、アクチン繊維の重合を司る低分子量 G タンパク質である。我々は、RhoA が BAG6 と複合体形成すること、BAG6 をノックダウンすると、RhoA 制御下にあるストレスファイバー (アクチン繊維) の形成に顕著な欠損を

生じることを見いだした。この表現型と一致して、極めて安定な内在性 RhoA が、BAG6 ノックダウンにより急速にポリユビキチン化され消失していく。BAG6 抑圧の表現型（ストレスファイバー消失）は、活性型 RhoA の過剰発現により復帰することから、RhoA 活性は、ヌクレオチド交換サイクルだけではなく、タンパク質分解を介した精緻な量的制御を受けていることを示唆している (Miyauchi et al., 2023)。BAG6 の機能欠損が、RhoA の制御下にある細胞接着・細胞遊走の変化に寄与する可能性を新しく見出すことにも成功した (Miyauchi et al., 2023)。このように、低分子量 G タンパク質の新しい活性制御と意義の提案を目指して展開した本研究は、当初の目的に沿った成果の数々を挙げることができた。従って本研究は、低分子量 G タンパク質が司る様々な病態・生理を理解する上で、不可欠な視点を提供したと考えられる。

#### 欧文原著論文

1. Miyauchi, M., Matsumura, R., and Kawahara, H. (2023) BAG6 supports stress fiber formation by preventing the ubiquitin-mediated degradation of RhoA. *Mol. Biol. Cell.* 34: doi: 10.1091/mbc.E22-08-0355.
2. Takahashi, T., Shirai, J., Matsuda, M., Nakanaga, S., Matsushita, S., Wakita, K., Hayashishita, M., Suzuki, R., Noguchi, A., Yokota, N., and Kawahara, H. (2023) Protein quality control machinery supports primary ciliogenesis by eliminating GDP-bound Rab8-family GTPases. *iScience* 26, 106652, doi.org/10.1016/j.isci.2023.106652
3. Hagiwara, T., Minami, R., Ushio, C., Yokota, N., and Kawahara, H. (2023) Proteotoxic stresses stimulates dissociation of UBL4A from the tail-anchored protein recognition complex. *Biochem. J. (London)* 480(19): 1583-1598. doi: 10.1042/BCJ20230267
4. Mimami, S., Yokota, N., and Kawahara, H. (2020) BAG6 contributes glucose uptake by supporting the cell surface translocation of the glucose transporter GLUT4. *Biol. Open.* 9, bio047324. doi:10.1242/bio.047324

5. Matsuura, Y., Noguchi, A., Yokota, N., and Kawahara, H. (2020) Nuclear accumulation of ZFP36L1 is cell cycle-dependent and determined by a C-terminal serine-rich cluster.

*J. Biochem.* 168, 477-489. doi: 10.1093/jb/mvaa072

## 和文総説論文

1. 川原 裕之、南 雪也、宮内 真帆、高橋 俊樹 (2020)

「ミニレビュー：プレエンプティブ品質管理を介した膜タンパク質の選択的分解機構」

生化学 第92巻第2号, pp. 247-252, doi:10.14952/SEIKAGAKU.2020.920247

2. 川原 裕之 (2021)

「プレエンプティブ品質管理を介した不良タンパク質のサーベイランスとその意義」

月刊「細胞」 3月号, 53巻, pp. 179 - 181.

## 招待講演

1. 川原 裕之, 白井 詢, 中永 早映, 高橋 俊樹 (2022) 「ユビキチン化を介したRabファミリー低分子量Gタンパク質の新しい制御機構」 日本生化学会 第95回全国大会シンポジウム「ユビキチン・プロテアソーム研究のニューフロンティア」名古屋国際会議場 2022年11月11日(金)

2. Hiroyuki Kawahara (2022) Pre-emptive quality control machinery supports vesicular trafficking by ubiquitinating GDP-bound Rab-family small GTPases. 23<sup>rd</sup> TMIMS international Symposium, New Frontiers in Ubiquitin Proteasome System. December 6, 2022, TMIMS Auditorium, Tokyo

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takahashi T, Shirai J, Matsuda M, Nakanaga S, Matsushita S, Wakita K, Hayashishita M, Suzuki R, Noguchi A, Yokota N, *Kawahara H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Protein quality control machinery supports primary ciliogenesis by eliminating GDP-bound Rab8-family GTPases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	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） 10.1016/j.isci.2023.106652	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 Miyachi M, Matsumura R, *Kawahara H.	4. 巻 34
2. 論文標題 BAG6 supports stress fiber formation by preventing the ubiquitin-mediated degradation of RhoA.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell.	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） 10.1091/mbc.E22-08-0355	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 川原 裕之	4. 巻 53
2. 論文標題 プレエンティブ品質管理を介した不良タンパク質のサーベイランスとその意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 179 - 181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Mimami, S., Yokota, N., and Kawahara, H.	4. 巻 9
2. 論文標題 BAG6 contributes glucose uptake by supporting the cell surface translocation of the glucose transporter GLUT4.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biol. Open	6. 最初と最後の頁 bio047324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.047324	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 Matsuura, Y., Noguchi, A., Yokota, N., and Kawahara, H.	4. 巻 168
2. 論文標題 Nuclear accumulation of ZFP36L1 is cell cycle-dependent and determined by a C-terminal serine-rich cluster.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 477-489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.047324	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 川原 裕之、南 雪也、宮内 真帆、高橋 俊樹	4. 巻 92
2. 論文標題 プレエンティブ品質管理を介した膜タンパク質の選択的分解機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920247	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 Hagiwara, T., Minami, R., Ushio, C., Yokota, N., and Kawahara, H.	4. 巻 480
2. 論文標題 Proteotoxic stresses stimulates dissociation of UBL4A from the tail-anchored protein recognition complex.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem. J. (London)	6. 最初と最後の頁 1583-1598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20230267	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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 川原 裕之
2. 発表標題 ユビキチン化を介したRabファミリー低分子量Gタンパク質の新しい制御機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawahara H
2. 発表標題 Pre-emptive quality control machinery supports vesicular trafficking by ubiquitinating GDP-bound Rab-family small GTPases.
3. 学会等名 23rd TMIMS international Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮内 真帆, 川原 裕之
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質RhoAのコピキチン化を介したストレスファイバー制御の新規メカニズム
3. 学会等名 日本生化学会 第95回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井 詢, 高橋 俊樹, 川原 裕之
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質のコピキチン化を介したエクソソーム分泌の新機構
3. 学会等名 日本生化学会 第95回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊樹, 川原裕之
2. 発表標題 GDP型Rabタンパク質分解制御因子の同定とその生理的意義の解明
3. 学会等名 日本生化学会 第95回全国大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 中永早映, 高橋俊樹, 川原裕之
2. 発表標題 リソソーム酸性化を制御するv-ATPaseの新規輸送制御機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会 第95回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 全学哲, 川原裕之, 高橋俊樹
2. 発表標題 Rab3サブファミリータンパク質の安定性比較と調節機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会 第95回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野歩美, 白井詢, 川原裕之, 横田直人
2. 発表標題 X連鎖精神遅滞を引き起こすRab39bの新規分解機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会 第95回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩佐康之, 川原裕之
2. 発表標題 NMD由来不良タンパク質の代謝におけるユビキチン系の役割
3. 学会等名 日本生化学会 第95回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白井詢、高橋俊樹、川原裕之
2. 発表標題 細胞内輸送ネットワークの新規制御機構を介したエクソソーム分泌調節メカニズムの解明
3. 学会等名 TOBIRA Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shirai, J., Takahashi, T., Kawahara, H
2. 発表標題 Ubiquitin-dependent degradation of Rab9a regulates exosome secretion.
3. 学会等名 The International Symposium, Ubiquitin New Frontier (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakanaga. S, Takahashi, T., Kawahara, H
2. 発表標題 Ubiquitin-dependent degradation of Rab proteins regulate lysosomal acidity.
3. 学会等名 The International Symposium, Ubiquitin New Frontier (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 S. Nakanaga, T, Takahashi, H. Kawahara
2. 発表標題 The function of the BAG6 complex in regulating lysosomal Rab proteins.
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原 裕之
2. 発表標題 ユビキチン化を介した低分子量Gタンパク質群の新しい調節機構
3. 学会等名 新学術領域「ケモユビキチン」第5回領域会議（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井 詢、川原裕之
2. 発表標題 タンパク質分解を介した低分子量Gタンパク質Rab9aの新しい制御機構
3. 学会等名 日本生化学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原 裕之
2. 発表標題 新合成膜タンパク質の品質管理におけるRabシャペロンの新しい機能
3. 学会等名 新学術領域「ケモユビキチン」第6回領域会議（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋俊樹、川原裕之
2. 発表標題 ユビキチン化を介したRabファミリー低分子量Gタンパク質の調節機構
3. 学会等名 新学術領域研究「ケモユビキチン」第4回若手主体発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 1.Matsuura, Y., Noguchi, A., Yokota, N., Fujita, K. Fukumura, K., Mayeda, A., and Kawahara, H.
2. 発表標題 Possible new splicing mechanism via intronic ARE. " Forum: Challenge to resolve mysteries in the RNA-mediated regulation of gene expression.
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞生化学研究室ホームページ <a href="https://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=celche">https://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=celche</a> 東京都立大学理学部生命科学科細胞生化学研究室webページ <a href="https://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=celche">https://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=celche</a>
--

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
---------	---------