

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15739

研究課題名（和文）分泌経路を制御する新規Rab6エフェクターの探索

研究課題名（英文）Study on Rab6 effectors that regulate the secretory pathway

研究代表者

本間 悠太（Homma, Yuta）

国立感染症研究所・細胞化学部・流動研究員

研究者番号：70812642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、哺乳類細胞における分泌経路で働く低分子量Gタンパク質Rab6の機能メカニズムを明らかにするため、Rab6と共に働くタンパク質の生化学的・遺伝学的な探索を試みた。その結果、GARP複合体の一部であるVPS52がRab6と同様に分泌経路に必要であり、VPS52を欠失した培養細胞においては分泌されるべきタンパク質の一部がリソソームへ運ばれてしまうことを明らかにした。またこのVPS52の機能には、機能未知のC末端側のアミノ酸領域が必要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分泌経路は、細胞が様々な分泌分子（可溶性分泌タンパク質や膜タンパク質）を細胞外（細胞膜）へと輸送する主要な経路であるが、それぞれの分泌分子がどのように選別・輸送されているかについての分子メカニズムは不明な点も多く残されている。本研究によってVPS52が分泌経路で機能することが明らかにされたことで、細胞の根幹的機能である分泌現象の基礎的な理解を進展させるとともに、分泌異常に関連する疾患の病態解明・治療等につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：A small GTPase Rab6 regulates the secretory pathway in mammalian cells, however, the molecular mechanism was not fully understood. In this study, biochemical and genetic analyses revealed the requirement of VPS52, a subunit of the GARP complex, for the secretory pathway. I showed that secretory cargos are not efficiently secreted and missorted to lysosomes in VPS52-deficient cells, the same as in Rab6-deficient cells. The functionally unknown C-terminal half of VPS52 was shown to be required for the secretory pathway.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Rab 小胞輸送 分泌経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分泌経路は、細胞が分泌分子(可溶性分泌タンパク質や膜タンパク質)を細胞外(細胞膜)へと輸送する主要な経路であるが、特にゴルジ体以降について、どのように分泌分子の輸送・選別が行われているか不明な点も多い。これまでの研究で、低分子量 G タンパク質である Rab6 のノックアウト細胞が、基底膜形成不全と分泌不全(および分泌分子のリソソームへの蓄積)の二つの表現型を示すことを明らかにしていた。Rab の機能を理解するためには、活性型 Rab に特異的に結合する分子(エフェクター)を同定することが重要であり、これまでに、Rab6 のエフェクターとしていくつかの分子が報告されている。そこで本研究では、Rab6 による分泌経路の制御機構を解明するため、Rab6 エフェクター分子のうち、ELKS、Bicaudal-D、VPS52、GCC185、TMF1 の 5 種類に着目した。これらのエフェクター候補遺伝子のノックアウト細胞を作製し、Rab6 ノックアウト細胞と同じ表現型を示すかどうか検証することを計画した。

2. 研究の目的

Rab6 エフェクター分子の解析により、Rab6 がどのようにタンパク質の分泌経路、特にゴルジ体以降の小胞輸送を制御するかを明らかにする。

3. 研究の方法

細胞は、イヌ腎臓上皮由来の MDCK 細胞を用いた。CRISPR-Cas9 技術により、ELKS1/2、Bicaudal-D1/2、VPS52、GCC185、TMF1 のノックアウト細胞を作製した(右表)。

・分泌タンパク質の分泌効率の評価

シグナルペプチドを付加した GFP をモデル分泌分子として用いた。この分泌型 GFP を各ノックアウト細胞に安定発現させ、培養上清に分泌された分泌型 GFP を、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降法により回収し、ウェスタンブロッティングにより定量した。

・分泌タンパク質の細胞内局在の評価

分泌型 GFP が細胞内のどこに分布しているかについて、抗 GFP 抗体により免疫染色することで評価した。また抗 LAMP2 抗体を用いた共免疫染色により、分泌型 GFP のリソソーム局在について評価した。

Cell line	KO protein	Mutation(s)
Rab6-KO	Rab6A	+1 bp/-1 bp
	Rab6B	+1 bp/+2 bp
ELKS-KO	ELKS1	+1 bp
	ELKS2	+1 bp
BICD-KO	Bicaudal-D1	+1 bp
	Bicaudal-D2	+2 bp/-7 bp
VPS52-KO	VPS52	-13 bp/-112 bp
GCC185-KO	GCC185	-4 bp/-8 bp
TMF1-KO	TMF1	+1 bp

4. 研究成果

作製したノックアウト細胞について、まず分泌型 GFP を用いた分泌効率の評価を行った。その結果、VPS52 ノックアウト細胞においてのみ、Rab6 ノックアウト細胞と同様に有意に分泌型 GFP の分泌量が減少していた(図1)。

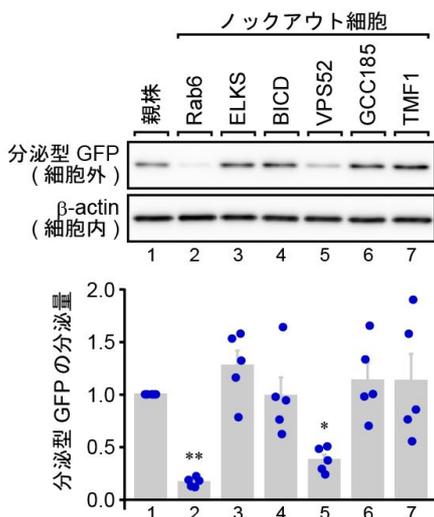


図1. 各ノックアウト細胞における分泌型 GFP の分泌量

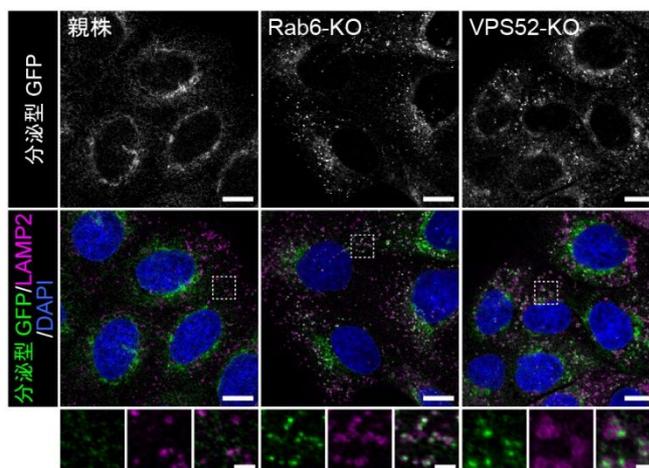


図2. VPS52 ノックアウト細胞における分泌型 GFP の細胞内局在

このとき、細胞内の分泌型 GFP の量は Rab6 および VPS52 ノックアウト細胞において増加していた。そこで分泌型 GFP の細胞内局在を調べたところ、親株（正常細胞）では主に小胞体やゴルジ体にシグナルが見られたが、Rab6 および VPS52 ノックアウト細胞においてはリソソームにも局在していた（図 2）。

VPS52 は細胞内逆行性輸送を制御する GARP 複合体のサブユニットの一つである。分子内に多数のヘリックス構造が予測される 723 アミノ酸からなるタンパク質であり、N 末端側のコイルドコイル領域で他の GARP 複合体と結合すると考えられている（図 3）。一方、C 末端側にも多数のヘリックス予測領域があるが、その詳細な機能はわかっていない。そこで、C 末端側を段階的に欠失させた変異体を作製し、これらを発現させることで VPS52 ノックアウト細胞の表現型がレスキューされるかどうか検証した。

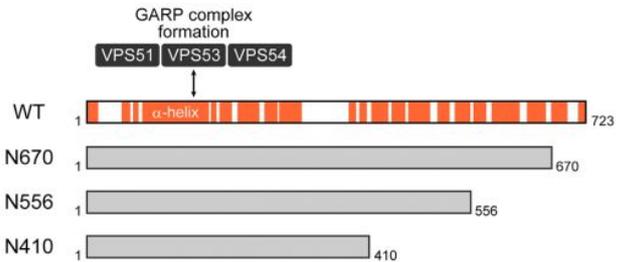


図 3 . VPS52 のドメイン構造と作製した変異体

野生型 VPS52 および各 C 末端側欠失変異体を発現させた VPS52 ノックアウト細胞を用いて分泌型 GFP の分泌アッセイを行ったところ、野生型 VPS52 および N670 変異体を発現する細胞では親株と同等まで分泌効率が回復した一方で、N410 変異体では全く回復しなかった。（図 4）。N556 変異体は統計的有意差はつかないものの、レスキュー効率は低い傾向が見られた。

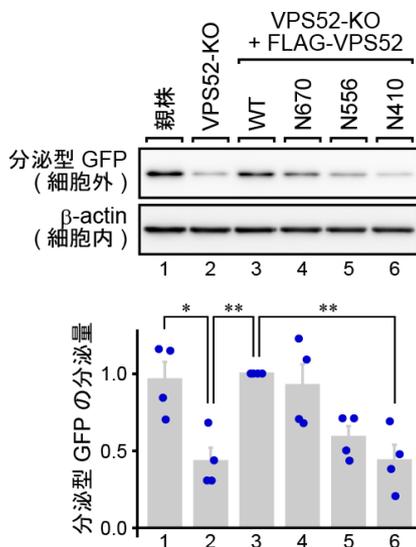


図 4 . 各 VPS52 変異体発現細胞における分泌型 GFP の分泌量

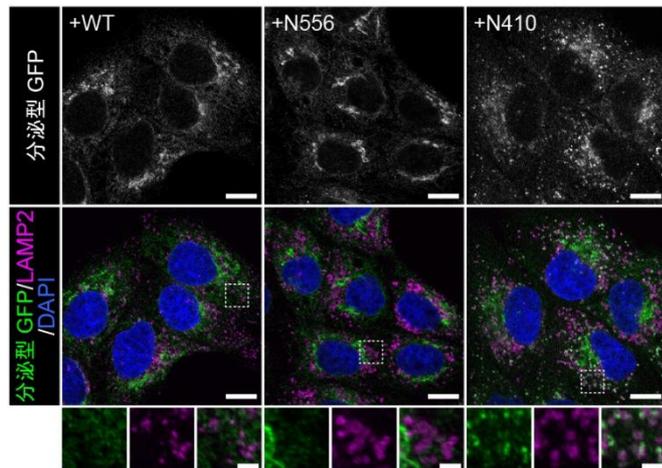


図 5 . 各 VPS52 変異体発現細胞における分泌型 GFP の細胞内局在

続いて、分泌型 GFP の細胞内局在を調べたところ、VPS52 ノックアウトによるリソソームへの異常局在は、野生型 VPS52 および N556 変異体では完全に回復した一方で、N410 変異体においては全く回復しなかった（図 5）。これらの結果から、分泌経路における VPS52 の機能には C 末端側の領域（特にアミノ酸 410-556）が重要であると考えられた。

GARP 複合体は、マンノース 6-リン酸受容体の逆行性輸送を介してリソソーム酵素の輸送を制御することで、リソソームの恒常性維持に寄与していると考えられている。VPS52 ノックアウト細胞ではリソソームの肥大化が観察されたが、Rab6 ノックアウト細胞では見られなかった（図 2）。また、N556 変異体により分泌型 GFP のリソソーム局在はレスキューされたが、リソソームの肥大化はレスキューされなかった（図 5）。従って、リソソームの恒常性維持と、分泌タンパク質がリソソームに送られずに正しく分泌されることは独立した現象であると考えられた。

また、基底膜形成への影響を調べるために、コラーゲンゲル包埋培養を行い抗ラミニン抗体を用いた免疫染色により基底膜形成を評価したが、VPS52 を含め、作製したエフェクター分子ノックアウト細胞において影響は見られなかった。従って、Rab6 ノックアウト細胞における基底膜形成不全は、分泌経路の異常とは直接関係ないことが示唆された。

以上の結果を総合し、VPS52 は分泌経路において Rab6 と共に働き、分泌分子が正しく細胞外へ輸送されるのに必要なエフェクター分子であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oguchi Mai E, Homma Yuta, Fukuda Mitsunori	4. 巻 -
2. 論文標題 The N-terminal Leu-Pro-Gln sequence of Rab34 is required for ciliogenesis in hTERT-RPE1 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Small GTPases	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） 10.1080/21541248.2021.1894910	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.e7
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 -
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 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 Osaki Futaba、Matsui Takahide、Hiragi Shu、Homma Yuta、Fukuda Mitsunori	4. 巻 -
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 -
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 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 Yoshikawa-Murakami Chikako、Mizutani Yuki、Ryu Akemi、Naru Eiji、Teramura Takashi、Homma Yuta、Fukuda Mitsunori	4. 巻 21
2. 論文標題 A Novel Method for Visualizing Melanosome and Melanin Distribution in Human Skin Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8514 ~ 8514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228514	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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