

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21770198

研究課題名（和文） オートファジーにおけるRab33B機能の包括的解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Rab33B in autophagy.

研究代表者

伊藤 敬 (Takashi Itoh)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：50373270

研究成果の概要（和文）：

Rab33B はオートファジーに必須なタンパク質である Atg16L1 と直接的な相互作用を示す Rab として申請者によって同定された。今回、Rab33B のオートファジーでの機能を明らかにする目的で、Rab33B 不活性化因子（GAP）の同定を行なった。そして、Rab の不活性化に必要な TBC ドメインを持ったタンパク質の中から OATL1 と呼ばれるタンパク質が Rab33B の GAP であることを見いだした。OATL1 を過剰発現させることで、細胞内の Rab33B が不活性化された状態にしたところ、オートファゴソームの成熟過程に遅延が認められた。これらの結果から、Rab33B はオートファゴソームとリソソームとの融合の過程という、オートファジーの後期の過程で機能しているということが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The direct interaction of Rab33B, a regulator of membrane trafficking, with Atg16L1, an essential factor for autophagy, suggests involvement of Rab33B in the regulation of autophagy. Here, I identified OATL1, an uncharacterized TBC protein, as an inactivation factor of Rab33B and addressed the function of Rab33B in autophagy to inactivate Rab33B by OATL1. Overexpression of OATL1, which would inactivate endogenous Rab33B, delayed autophagosomal maturation in MEF cells. On the other hand, overexpression of active-form mutant of Rab33B also delayed autophagosomal maturation. These results indicate that Rab33B plays a role in the fusion between autophagosomes and lysosomes, a later process of autophagy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：タンパク質分解、膜輸送

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジー（細胞内自食作用）は真核生物に広く保存された選択性のない細胞内タンパク質分解メカニズムである。高等真核生物であるほ乳動物においては、オートファジーは発生、抗原提示、細胞死、感染菌の駆除などの、高次機能に関わっていることが示されており、ほ乳動物のオートファジーの分子メカニズムの解明は基礎生物学のみならず医学的にも注目が集まっている。

ほ乳動物におけるオートファジーはオートファゴソームと呼ばれる特徴的なオルガネラの形成が行われるが、オートファゴソーム形成には非常にダイナミックな膜の挙動を伴う。初めに隔離膜と呼ばれる膜構造が伸長し、細胞質を包み込んだオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造を持つ小胞を形成する。オートファゴソーム中に隔離されたタンパク質、オルガネラ等はオートファゴソームとリソソームとの融合により分解され、生体物質のターンオーバーが行なわれる。オートファゴソーム形成は常にある程度のレベルで行なわれているが、アミノ酸飢餓や細菌の感染によって誘導される。

オートファジーに必須な遺伝子として、ATG 遺伝子群が同定されているが、Atg タンパク質には既知の膜輸送制御因子（Rab や SNARE など）が含まれておらず、オートファゴソーム形成における膜輸送機構は現在でも多くの部分が未解明である。

## 2. 研究の目的

申請者は膜輸送を制御する Rab の網羅的な解析の過程で、ゴルジ体に局在する Rab33 がオートファゴソーム形成に必須なタンパク質 Atg16L1 をエフェクターとして機能していることを明らかにし、Rab33 のオートファジーへの関与を世界に先駆けて同定した (Mol. Biol. Cell 2008 19:2916-2925)。この Rab33 と Atg16L1 との結合は未だ明らかになっていないオートファゴソーム形成における膜輸送機構の解明への大きな一歩となる可能性がある。Rab33 に関しては申請者の他に、ゴルジ体からの小胞輸送に関与しているという報告があるが、Rab33 の機能も明らかでない部分が多く、このゴルジ体での小胞輸送とオートファゴソーム形成の関連性に付いて詳しい解析はなされていない。そこで本申請では、Rab33 が制御する膜輸送機構がオートファゴソーム形成にどのように寄与しているのかを分子レベルで解析し、オートファゴソーム形成メカニズム解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) オートファジーに関与する Rab-GAP の探索

EGFP を融合した TBC タンパク質を発現するベクターを構築、MEF 細胞に導入した。飢餓処理後、細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、LC3 への特異的抗体で染色を行なった。そして共焦点顕微鏡にて観察を行ない、LC3 と共局在を示す TBC タンパク質を選抜した。

### (2) 結合実験

酵母 2 ハイブリッド法では、LC3, GABARAP, GATE-16 と OATL1 の全長、N 末端をそれぞれベクターに組み込み、酵母に導入した。導入後の酵母を選択培地で培養することで、結合活性を判定した。in vitro 結合実験では、LC3, GABARAP, GATE-16 と GST タグが融合した OATL1 の N 末端 (GST-OATL1-N) とを大腸菌に発現させ、精製した。精製タンパク質を混合し、グルタチオンセファロースビーズを用いて GST-OATL1 を沈降させた際、LC3, GABARAP, GATE-16 が共沈降するかどうかを調べることで結合を確認した。また、T7 タグを融合した OATL1 (T7-OATL1) を発現するレトロウィルスベクターを構築、作製したレトロウィルスを導入することで T7-OATL1 タンパク質を恒常的に発現する MEF 細胞を作製した。その細胞抽出液から、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 LC3 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。

### (3) オートファジー活性の評価

OATL1 や OATL1 の変異体 (LC3 との結合不全変異体、GAP 活性不全変異体) を恒常的に過剰発現させた MEF 細胞と、そのコントロール細胞を、飢餓処理もしくは飢餓処理に続いて栄養十分な環境に戻す処理を行った。それらの処理を行なった細胞を、パラフォルムアルデヒドで固定し、LC3 への特異的抗体で染色を行う。LC3 陽性のオルガネラ (オートファゴソーム) の細胞当たりの数を数える、もしくは破碎し、その細胞抽出液を用いてウェスタンブロッティングを行なうことで、脂質化された LC3 の量を定量する。といった方法でオートファジー活性を評価した。

### (4) 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 ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ ) 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。

#### 4. 研究成果

##### (1) オートファゴソームに局在する Rab-GAP の同定

TBC ドメインは Rab-GAP 活性を持つドメインと言うことが明らかになっている。ヒトゲノムにコードされている 41 種類の TBC ドメインを持つタンパク質の局在を調べ、オートファゴソームマーカータンパク質である LC3 と共局在する TBC タンパク質として、TBC1D2B と TBC1D25/OATL1 とを同定した。本研究課題では OATL1 の解析を行なった。

##### (2) OATL1 のオートファゴソーム局在化メカニズムの解明

OATL1 タンパク質の一次構造解析の結果、OATL1 には LC3, GABARAP, GATE-16 といった酵母 Atg8 のホモログとの結合に必要なアミノ酸配列を持つことが明らかになった。実際、結合実験を行なったところ、酵母 2 ハイブリッド法においても、in vitro 結合実験においても、OATL1 と LC3, GABARAP, GATE-16 との結合が認められた。更にこの配列に変異を入れた OATL1 を作製したところ (OATL1-WA, OATL1-ED/AA)、GABARAP との結合は失われ、OATL1 のオートファゴソーム局在も失われたことから、OATL1 は Atg8 ホモログとの結合を介して、オートファゴソームに局在することが明らかになった。

##### (3) OATL1 のオートファジーにおける役割

OATL1 のオートファジーにおける機能を調べるために、OATL1 を恒常的に過剰発現する MEF 細胞を作製した。栄養状態を変える事により細胞内のオートファジーを誘導、抑制した。LC3 の細胞染色を行なった結果、OATL1 が過剰発現されている細胞ではコントロール細胞と比べて、オートファジーを誘導した際のオートファゴソームの数が増加しており、またオートファジーの抑制を行なった際のオートファゴソームの消失に遅延が起こることが明らかになった。同様の現象は、オートファジー活性の一つの指標として用いられている脂質化された LC3 の量をウェスタンブロッティング法にて定量することでも確認された。これらの結果は OATL1 の過剰発現はオートファゴソームの成熟過程を遅延させていることを示唆している。オートファゴソームはエンドソーム、リソソームと融合する事によって成熟しオートファゴソームは消失するというモデルが考えられている。実際、免疫電顕法を用いることで、OATL1 の過剰発現はオートファゴソームがエンドソ

ームと融合しているが、リソソームと融合していない中間体であるアンフィソームと呼ばれるオルガネラが蓄積していることを確認することができた。

##### (4) OATL1 変異体の解析

上述したように、OATL1 は Atg8 ホモログと結合する活性が見いだされた。また TBC ドメインを持つため、Rab-GAP 活性を持つことが推測されている。実際にこれらの活性が OATL1 の過剰発現の効果に必要なかどうかをそれぞれの変異体を作製することで検証した。すると、Atg8 ホモログとの結合に必要なアミノ酸の置換、Rab-GAP 活性に必要なアミノ酸の置換、いずれの変異を持つ OATL1 の過剰発現でもオートファゴソームの成熟への影響がみられなかったため、どちらの活性も OATL1 の過剰発現の効果に必要なことが明らかになった。

##### (5) OATL1 の基質の同定

これまで OATL1 の基質となる Rab が明らかにされていなかったため、その同定を試みた。いくつかの Rab を検証したところ、OATL1 は Rab33B にもっとも強い Rab-GAP 活性を示すことが分かった。

##### (6) Rab33B 過剰発現の解析

OATL1 の基質となる Rab33B が OATL1 と同様にオートファゴソームの成熟過程に関与しているかを、Rab33B の活性化型固定変異体 (Rab33B-QL) を細胞に発現させる事によって検証した。Rab33B-QL が過剰発現された MEF 細胞では、オートファゴソームの成熟が遅延する表現型が確認された。また、細胞内に残ったオートファゴソームはリソソームと近接するように存在したことから、Rab33B-QL の過剰発現はオートファゴソームとリソソームの融合の過程を阻害していることが示唆された。

以上の結果から、Rab33B はオートファゴソームとリソソームとの融合を制御し、その機能は OATL1 という不活性化因子によって制御されているというモデルを考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1. Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., and Fukuda, M. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J. Cell Biol.* 192:839-853, 2011. (査読あり)
2. Tamura, K., Ohbayashi, N., Maruta, Y., Kanno, E., Itoh, T., and Fukuda, M. Varp is a novel Rab32/38-binding protein that regulates Tyrp1 trafficking in melanocytes. *Mol. Biol. Cell* 20:2900-2908, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計3件)

1. Itoh, T. Search for Rab-GAP involved in autophagy. 6th Autophagy Conference (Kakegawa, Japan) 2011.01.13
2. Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., and Fukuda, M. Identification of Rab-GAP involved in autophagy. 第32回日本分子生物学会年会(神戸) 2010.12.08
3. Itoh, T., Kanno, E., and Fukuda, M. Identification of Rab-GAP involved in autophagy. 新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」班会議(沖縄) 2009.11.10

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 敬 (Takashi Itoh)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教  
研究者番号：50373270

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし