

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770183

研究課題名（和文） 新規Rab32/38結合分子によるメラノソーム形成・成熟機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the molecular mechanism of biogenesis and maturation of melanosomes regulated by a novel Rab32/38-binding protein.

研究代表者

大林 典彦 (Ohbayashi Norihiko)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：40421979

研究成果の概要（和文）：

低分子量G蛋白質Rabは、ほ乳類において約60種類のアイソフォームが存在し、それぞれが様々な細胞内小胞の輸送を担っている。ほ乳類メラノサイトのメラノソームは、メラニンを合成し貯留する小胞で、これまでにRab27A、Rab32、Rab38の存在が報告されていた。本研究では、機能がよく分かっていなかったRab32/38に着目した。Rab32/38結合分子として我々が初めて単離したVarpの機能解析を通じ、Rab32/38とVarpによって構成される複合体によるメラニン合成酵素輸送メカニズムについての新しい知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Rab GTPases constitute a family of small GTPases that regulate a variety of membrane trafficking events in all eukaryotic cells by recruiting their specific effector molecules. It has been reported that Rab27A, Rab32, and Rab38 are localized on the melanosomes, however, little is known about the function(s) of Rab32/38 in melanocytes. We found a novel mechanism that underlies the transport of melanogenic enzymes to melanosomes regulated by Rab32/38 and Varp that is an effector molecule of Rab32/38.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：Rab、Varp、メラノソーム、膜輸送、チロシナーゼ、エフェクター

1. 研究開始当初の背景

皮膚や髪の毛に含まれるメラニンは、細胞を有害な紫外線から守るために重要な役割を果たすが、その一方で、しみやそばかすの原因でもあり、メラノソームで生成するメラニ

ン量を適切に制御することは生活の品質向上に不可欠である。Rab27Aは、成熟したメラノソーム輸送を制御する機能を持ち、Slac2-a、Slp2-aという2種類のエフェクタータンパク質と連携して、正常なメラノソ

ム輸送を行うことが既に示されている。さらに、メラノソーム上には Rab27A の他にも、Rab32 や Rab38 が発現していることが報告されていたが、Rab32/38 のエフェクター分子が発見されておらず、その機能は不明であった。我々は先行実験により、活性化型 Rab32/38 にのみ特異的に結合する分子として、VPS9 ドメインとアンキリンリピート (ANKR) をタンデムに有する Varp の同定に成功していた。また、Varp の N 末端側 ANKR (ANKR1) が Rab32/38 の結合に必須であること、Varp と Rab32/38 が培養メラノサイト (melan-a 細胞) に存在するメラノソーム上で共局在を示すこと、そしてメラノサイト内の Varp をノックダウンすると Rab32/38 ノックダウンと同様、メラニン合成酵素の 1 つである Tyrp1 のメラノソームへの局在に異常を来し、Tyrp1 の発現レベルが低下することを見出した。さらに、Varp ノックダウンによる Tyrp1 発現レベルの減少は、プロテアソーム阻害剤処理により通常レベルに回復することも明らかになった。これらの結果は、Varp がその ANKR1 を用いて活性化型 Rab32/38 と結合することにより Tyrp1 のメラノソームへの輸送過程を正しく制御すること、そして正しくメラノソームに輸送されなかった Tyrp1 はプロテアソーム依存的に分解されることを強く示唆していた。

2. 研究の目的

メラニン合成酵素輸送に関与する Rab32/38 のエフェクター分子 Varp の発見は、メラニン合成酵素輸送機構の全貌の解明に向けたブレイクスルーになるものと期待される。そこで本研究では、Varp-Rab32/38 複合体がメラニン合成酵素輸送に与える影響をより詳細に明らかにしていくことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

「Varp やメラニン合成酵素に対する抗体の作製」

先行実験から、Varp ノックダウンにより Tyrp1 のメラノソームへの輸送に異常が起きることは明らかになっているが、他のメラニン合成酵素 (チロシナーゼ、Tyrp2) は優れた抗体が入手困難であった。併せて、Varp についても、Western blot や細胞染色可能な抗体を作製する必要性があった。そこでまず、これらの組換えタンパク質やペプチドを精製し、抗体作製を行った。

「メラニン合成酵素分解メカニズムの探索」

Varp や Rab32/38 ノックダウンにより Tyrp1 の発現レベルが低下するといった先行

研究から、Varp と Rab32/38 によって構成される複合体は Tyrp1 の分解を直接制御するか、あるいは Tyrp1 の局在や輸送を正しく制御することで Tyrp1 のタンパク質分解系へのリクルートを抑制する機構があるのではないかと予想した。我々は、後者の仮説を検証するために、プロテアソーム阻害剤 (MG132 など) 処理を施し、発現レベルが回復した Tyrp1 の細胞内局在を免疫染色法により検討を試みた。

「Varp と Rab32/38 によって構成される複合体の生理的役割の解明」

Varp の N 末側 ANKR (ANKR1) 内に Rab32/38 結合領域が存在することは既に明らかになっているが、実際に ANKR1 内のどのアミノ酸配列が Rab32/38 との結合に必須であるかは不明である。そこで、Varp の C 末側 ANKR (ANKR2) や他の分子のアンキリンリピートと比較して、Varp ANKR1 に特異的な数種のアミノ酸分子に着目して点変異体分子を作製し、Rab32/38 との結合性の検討を酵母 two-hybrid 法や免疫沈降法、細胞生物学的手法を用いて解析した。一方で、Rab32/38 について他の Rab 分子には保存されていない Rab32、Rab38 に特異的なアミノ酸配列 (特に switch II 領域内のアミノ酸配列) に着目し点変異体分子を作製し、Varp と同様の実験を行った。

4. 研究成果

Varp、チロシナーゼ、Tyrp2 それぞれを特異的に認識する抗体作製に成功した。Varp に関しては、イムノプロットのみの適用となったが、チロシナーゼと Tyrp2 に関してはそれだけでなく、免疫沈降・免疫染色にも耐えるものであった。今後、Varp 非存在下における各種メラニン合成酵素の局在解析に向けた有用なツールとなることが期待される。

他の分子の ANKR (アンキリンリピート) と比較して Varp ANKR に特異的なアミノ酸や、Rab32/38 の switch II 領域に存在する特異的なアミノ酸に着目し、数種の点変異体分子を作成し、酵母 two-hybrid 法と共免疫沈降法による結合性の検討を行った。その結果、Varp と Rab32/38 双方で Varp-Rab32/38 間の結合に必須なアミノ酸を同定することに成功した。すなわち、Varp と結合できない Rab32 (V92A) 変異体、Rab38 (V78A) 変異体と、Rab32/38 と結合できない Varp (Q509A) および Varp (Y550A) を得ることができた。

次に、これらの点変異体を色素細胞に発現させると、Varp と Rab32/38 の共局在性が認められなくなることを見いだした。また、色素細胞から内在性 Varp、あるいは Rab32/38

をノックダウンすると、Tyrp1 のメラノソームへの輸送に異常が生じ、Tyrp1 の発現レベルが低下する。この表現形は siRNA 耐性 Varp や Rab38 を色素細胞に発現させることでレスキューされることを確認した。そこで、Varp ノックダウン、あるいは、Rab32/38 ノックダウン色素細胞中に、双方が結合できない変異体 Varp、あるいは Rab38 を発現させて Tyrp1 のレスキューを試みたが、表現形の回復は認められなかったことから、Varp と Rab32/38 が複合体を形成することが、メラノソームへの Tyrp1 輸送に重要な役割を担うことが強く示唆された。

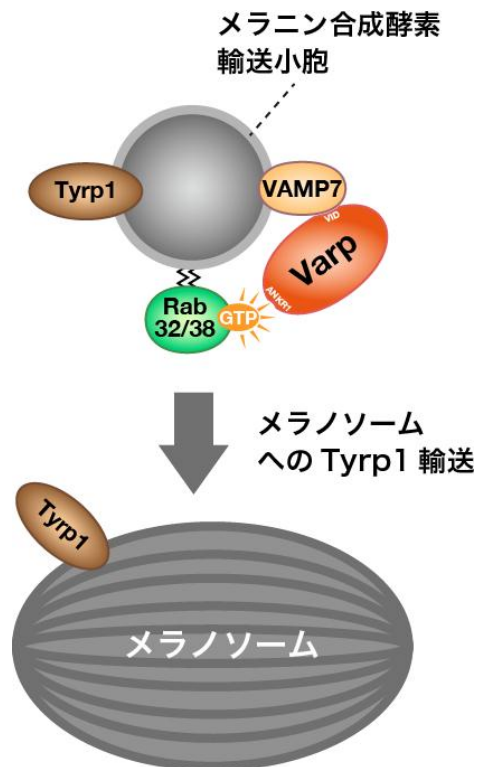


図1 Rab32/38-Varp 複合体の機能

Rab には内因性 GTP アーゼ活性が存在する。既に得ている Rab32(V92A) 変異体、Rab38(V78A) 変異体 (: Varp と結合できない点変異体) について、この GTP アーゼ活性が亢進している可能性が考えられた。そこで、Rab32/38 変異体について GTP アーゼ活性を in vitro で測定したところ、野生型 Rab32/38 との差が認められなかった。従って、Rab32/38 点変異による GTP アーゼ活性上昇の可能性は棄却することができ、Rab32/38 変異体はエフェクターである Varp との結合性に異常をきたすものと結論づけた。次に、Rab32/38 変異体と Varp 変異体の色素細胞における局在を検討した。野生型 Rab32/38 と野生型 Varp は Tyrp1 陽性小胞上に局在した。

野生型 Rab32/38 と変異型 Varp を発現させると、Rab32/38 は Tyrp1 陽性小胞に局在するものの、変異型 Varp は Tyrp1 陽性小胞に局在できなかった。一方、変異体 Rab32/38 はメラノソームに局在するものの、野生型 Varp が Tyrp1 陽性小胞にリクルートされなかった。これらの知見を併せて考えると、Tyrp1 陽性小胞において Rab32/38 と Varp が複合体を形成することが、Tyrp1 のメラノソームへの輸送に必須であると考えられた。さらに、Varp の二つのアンキリンリピートに挟まれた領域 (VID) に SNARE タンパク質の一つである VAMP7 が結合し、Varp-VAMP7 間の結合は Tyrp1 輸送に必須であるとの知見を得ることができ、今後のメラニン合成酵素輸送と SNARE の関連性について研究の起点となりうるものと期待される (図1)。

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5件)

- ① Tamura, K., Ohbayashi, N., Ishibashi, K., and Fukuda, M. (2011) Structure-function analysis of VPS9-ankyrin-repeat protein (Varp) in the trafficking of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes. *J Biol Chem* 286, 7507-7521
DOI: 10.1074/jbc.M110.191205
(査読有)
- ② Fukuda, M., Kobayashi, H., Ishibashi, K., and Ohbayashi, N. (2011) Genome-wide investigation of the Rab binding activity of RUN domains: development of a novel tool that specifically traps GTP-Rab35. *Cell Struct Funct* 36, 155-170
DOI: 10.1247/csf.11001
(査読有)
- ③ Beaumont, K. A., Hamilton, N. A., Moores, M. T., Brown, D. L., Ohbayashi, N., Cairncross, O., Cook, A. L., Smith, A. G., Misaki, R., Fukuda, M., Taguchi, T., Sturm, R. A., and Stow, J. L. (2011) The recycling endosome protein Rab17 regulates melanocytic filopodia formation and melanosome trafficking. *Traffic* 12, 627-643
DOI: 0.1111/j.1600-0854.2011.01172.x
(査読有)
- ④ Ohbayashi, N., Mamishi, S., Ishibashi,

K., Maruta, Y., Pourakbari, B., Tamizifar, B., Mohammadpour, M., Fukuda, M., and Parvaneh, N. (2010) Functional characterization of two RAB27A missense mutations found in Griscelli syndrome type 2. *Pigment Cell Melanoma Res* 23, 365-374
DOI: [0.1111/j.1755-148X.2010.00705.x](https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00705.x)

(査読有)

- ⑤ Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H., Matsui, T., Ohbayashi, N., and Fukuda, M. (2010) Comprehensive screening for novel rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic* 11, 491-507
DOI: [10.1111/j.1600-0854.2010.01038.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01038.x)

(査読有)

[学会発表] (計3件)

- ① 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会(神戸)2010年12月7日 大林典彦、田村可奈子、石橋弘太郎、福田光則 「Varpは新規Rab32/38 エフェクターとしてメラノソーム成熟に関与する」
- ② 新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」班会議(札幌)2010年6月30日 田村可南子、大林典彦、石橋弘太郎、福田光則 「Varp-Rab32/38 複合体のメラノサイトにおける生理的意義の解明」
- ③ 第62回日本細胞生物学会大会(大阪)2010年5月21日 松井貴英、大林典彦、丸田優人、伊藤敬、福田光則 「Rab36はダイニン・ダイナクチン複合体依存的にリソソームの核周辺への凝集を引き起こす」

[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]

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/fukuda_lab/home-ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林 典彦 (Norihiko Ohbayashi)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：40421979

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：