

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04367

研究課題名(和文) Rab35活性化による神経突起伸長の誘導機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of Rab35-activation-dependent neurite outgrowth

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：高次脳機能を司る神経細胞のネットワークは、神経細胞同士が神経突起を互いに伸ばし、シナプスを形成することにより成り立っている。神経突起の伸長には脂質膜の供給が不可欠であり、近年小胞輸送の制御因子・低分子量G蛋白質Rabの関与が示唆されている。これまで当研究室では、Rab8やRab35などによるリサイクリングエンドソームから突起方向への小胞輸送機構の存在を明らかにしてきたが、どのような仕組みでこれらのRabが活性化され、神経突起の伸長が促進されるのかは明らかではなかった。本研究課題では、これらのRabの上流活性化因子(GEF)を同定し、Rab活性化の分子基盤の一端の解明に成功した。

研究成果の概要(英文)：Neurite outgrowth, which is a prerequisite for neuronal network formation, requires massive addition of proteins and lipids to the tips of growing neurites by membrane trafficking. Accumulating evidence has suggested that several Rab small GTPases such as Rab8 and Rab35 on recycling endosomes promote neurite outgrowth, but their regulatory mechanisms during neurite outgrowth are poorly understood. In this study, we identified DENND1A as a Rab35-GEF and Rabin8 as a Rab8-GEF and found that both GEFs are required for neurite outgrowth of PC12 cells. Knockdown of Rabin8 resulted in inhibition of neurite outgrowth, whereas its overexpression promoted it. We also found that Rabin8 is recruited to recycling endosomes in a Rab11-dependent manner and that it activates Rab8 and Rab10 there during neurite outgrowth. Furthermore, we comprehensively screened TBC proteins/Rab-GAPs and Rabs and succeeded in identifying TBC1D12 and Rab20 as novel negative regulators of neurite outgrowth.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低分子量G蛋白質Rab 神経突起伸長 小胞輸送 エフェクター グアニンヌクレオチド交換因子 神経成長因子 スクリーニング Rabカスケード Rab

### 1. 研究開始当初の背景

高次脳機能を司る神経細胞のネットワークは、神経細胞同士が神経突起と呼ばれる構造を互いに伸ばし、シナプスを形成することにより成り立っている。神経突起を伸長するためには、細胞骨格の再編成に加えて、突起を伸ばすための脂質膜の供給（すなわち小胞輸送）が不可欠であり、近年小胞輸送の普遍的制御因子である低分子量G蛋白質Rabの神経突起伸長への関与が示唆されている。これまで当研究室では、Rab8やRab35などによるリサイクリングエンドソームから突起方向への小胞輸送機構の存在を明らかにしてきたが、神経成長因子(NGF)などのシグナルを受けてどのような仕組みでこれらのRabが活性化され、神経突起の伸長が促進されるのかは明らかではなかった。一般的に、RabはGTPを結合した活性化型とGDPを結合した不活性化型の二つの状態を取り、GTP型とGDP型のサイクルは活性化因子(グアニンヌクレオチド交換因子:GEF)及び不活性化因子(GTPアーゼ活性化蛋白質:GAP)により制御されると考えられている。しかし、RabのGEFやGAPの神経突起伸長制御への関与はこれまでほとんど解析されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、NGF刺激により神経細胞様に分化させたPC12細胞を神経突起伸長のモデル系に用いて、Rab8やRab35の上流活性化因子であるGEFを同定し、その機能解析を通してRab活性化の分子基盤の解明を目的とした。また、Rabの不活性化因子と考えられているTBC蛋白質をゲノムワイドで網羅的に探索することにより、神経突起伸長を負に制御する仕組みの解明にも着手した。

### 3. 研究の方法

(1)ヒトやマウスに存在する約40種類のRab-GEF候補のうち、*in vitro*でRab35-GEF活性を有すると考えられる幾つかの分子に焦点を当て、培養細胞レベルでRab35の活性化能を有するかを、GTP-Rab35プルダウン法により検証した(*Methods Mol. Biol.* 2015; 1298:207-216)。Rab35活性化能を有していたものに関しては、特異的なsiRNAを用いて内在性分子のノックダウンを行い、神経突起伸長に対する影響を検討した。

(2)Rab8の活性化因子として知られているRabin8に着目し、この分子のGEF活性の特異性を酵母two-hybrid法(baitとして常時不活性化型・活性化型Rab変異体を使用)を用いて再検証すると共に、Rabin8のノックダウンあるいは過剰発現による神経突起伸長への影響を検討した。

(3)Rab不活性化に関わるTBCドメインを持つ43種類のTBC蛋白質にGFPを付加し、神経突起伸長への関与が示唆されるリサイク

リングエンドソームに局在するものをスクリーニングした。次に、リサイクリングエンドソームに局在したTBC蛋白質の神経突起伸長への関与を検討するため、siRNAによるノックダウンあるいは過剰発現実験を行った。

(4)Rab8やRab35以外に神経突起伸長を制御する新規のRabを同定するため、siRNAによる全てのRabの網羅的ノックダウンスクリーニングを行った。

### 4. 研究成果

(1)GTP-Rab35プルダウン法による解析の結果、DENND1A/Bの2種類の分子が細胞内で強いRab35-GEF活性を示すことが明らかになった。次に、PC12細胞でこれらの分子のノックダウンを行ったところ、DENND1Aのノックダウンでのみ神経突起の伸長が顕著に抑制された。従って、DENND1Aが神経突起伸長時におけるRab35の上流活性化因子として機能している可能性が強く示唆された。

(2)Rab変異体をbaitに用いた酵母two-hybrid法による解析の結果、Rabin8はRab3/8だけでなく、Rab10の活性化能も有していること、活性化型のRab11に特異的に結合することが明らかになった(図1)。その後の局在解析

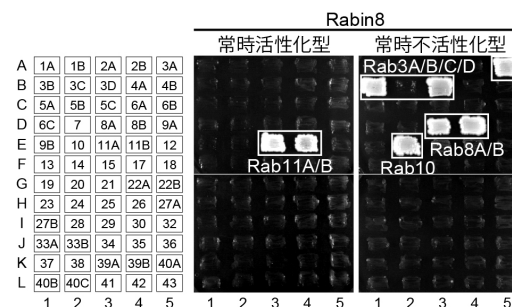


図1 Rabin8のRabの基質・結合特異性

から、Rabin8はRab11依存的にリサイクリングエンドソームに局在することにより、Rab8やRab10の活性化を介して神経突起伸長を促進することを突き止めた。また、Rabin8のGEF活性欠損変異体の解析から、Rabin8にはRab8/10のGEF活性非依存的に神経突起伸長を促進する効果が備わっているという意外な事実も見出し、この効果にはRab11との結合が必須であることも明らかにした。

(3)TBC蛋白質の局在解析から、TBC1D12が活性化型のRab11に特異的に結合してリサイクリングエンドソームに局在すること、及びRab11依存的に神経突起伸長の制御に関与することを明らかにした。興味深いことに、このTBC1D12による神経突起伸長制御にはRabの不活性化(GAP活性)は関与せず、むしろTBC1D12はRab11のエフェクター分子として機能することが示唆された(図2)。

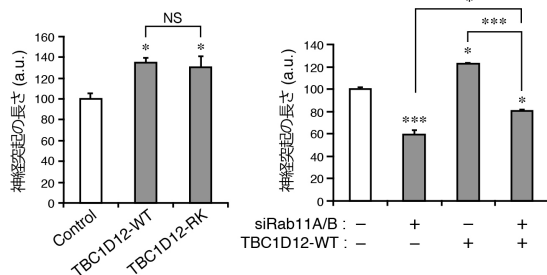


図2 TBC1D12の神経突起伸長への影響  
(左) TBC1D12の野生型(WT)とGAP活性欠損変異体(RK)による神経突起伸長の促進。  
(右) TBC1D12による神経突起伸長の促進はRab11ノックダウンにより消失。

(4) Rabの網羅的ノックダウンスクリーニングを行い、神経突起伸長を負に制御する新たなRabとしてRab20を同定することに成功した。すなわち、PC12細胞に内在性のRab20をノックダウンすると神経突起伸長が有意に促進されたが、逆に野生型Rab20や常時活性化型変異体の過剰発現により神経突起伸長は著しく阻害された。このRab20による神経突起伸長の抑制はswitch II領域(エフェクター結合部位)のアミノ酸変異により消失することから、特異的なRab20エフェクター分子との結合がこの抑制効果には不可欠と考えられた。今後、神経突起伸長を負に制御するRab20エフェクターの同定も引き続き行っていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計21件)

- ① Oguchi, M. E., Etoh, K. & Fukuda, M. (2018) Rab20, a novel Rab small GTPase that negatively regulates neurite outgrowth of PC12 cells. *Neurosci. Lett.* 662, 324-330 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.neulet.2017.10.056
- ② Ohbayashi, N., Fukuda, M. & Kanaho, Y. (2017) Rab32 subfamily small GTPases: pleiotropic Rabs in endosomal trafficking. *J. Biochem.* 162, 65-71 (査読あり)  
doi: 10.1093/jb/mvx027
- ③ Klein, O., Roded, A., Zur, N., Azouz, N. P., Pasternak, O., Hirschberg, K., Hammel, I., Roche, P. A., Yatsu, A., Fukuda, M., Galli, S. J. & Sagi-Eisenberg, R. (2017) Rab5 is critical for SNAP23 regulated granule-granule fusion during compound exocytosis. *Sci. Rep.* 7, 15315 (査読あり)  
doi: 10.1038/s41598-017-15047-8
- ④ Li, C., Wei, Z., Fan, Y., Huang, W., Su, Y., Li, H., Dong, Z., Fukuda, M., Khater, M. & Wu, G. (2017) The GTPase Rab43 controls the anterograde ER-Golgi trafficking and sorting of GPCRs. *Cell Rep.* 21, 1089-1101 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.celrep.2017.10.011
- ⑤ Oguchi, M. E., Noguchi, K. & Fukuda, M. (2017) TBC1D12 is a novel Rab11-binding protein that modulates neurite outgrowth of PC12 cells. *PLoS One* 12, e0174883 (査読あり)  
doi: 10.1371/journal.pone.0174883
- ⑥ Kabayama, H., Tokushige, N., Takeuchi, M., Kabayama, M., Fukuda, M. & Mikoshiba, K. (2017) Parkin promotes proteasomal degradation of synaptotagmin IV by accelerating polyubiquitination. *Mol. Cell. Neurosci.* 80, 89-99 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.mcn.2017.02.006
- ⑦ Aoki, Y., Manzano, R., Lee, Y., Dafinca, R., Aoki, M., Douglas, A. G. L., Varela, M. A., Sathyaprakash, C., Scaber, J., Barbagallo, P., Vader, P., Mäger, I., Ezzat, K., Turner, M. R., Ito, N., Gasco, S., Ohbayashi, N., El-Andaloussi, S., Takeda, S., Fukuda, M., Talbot, K. & Wood, M. J. A. (2017) *C9orf72* and *RAB7L1* regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain* 140, 887-897 (査読あり)  
doi: 10.1093/brain/awx024
- ⑧ Ishida, M., Marubashi, S. & Fukuda, M. (2017) M-INK, a novel tool for visualizing melanosomes and melanocores. *J. Biochem.* 161, 323-326 (査読あり)  
doi: 10.1093/jb/mvw100
- ⑨ Furusawa, K., Asada, A., Urrutia, P., Gonzalez-Billault, C., Fukuda, M. & Hisanaga, S. I. (2017) Cdk5 regulation of the GRAB-mediated Rab8-Rab11 cascade in axon outgrowth. *J. Neurosci.* 37, 790-806 (査読あり)  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2197-16.2016
- ⑩ Mrozowska, P. S. & Fukuda, M. (2016) Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in epithelial cells. *Small GTPases* 7, 231-238 (査読あり)  
doi: 10.1080/21541248.2016.1211068
- ⑪ Ishida, M., Oguchi, M. E. & Fukuda, M. (2016) Multiple types of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for Rab small GTPases. *Cell Struct. Funct.* 41, 61-79 (査読あり)  
doi: 10.1247/csf.16008

- ⑫ Fukuda, M. (2016) Multiple roles of VARP in endosomal trafficking: Rabs, retromer components and R-SNARE VAMP7 meet on VARP. *Traffic* 17, 709-719 (査読あり)  
doi: 10.1111/tra.12406
- ⑬ Villarroel-Campos, D., Henriquez, D. R., Bodaleo, F. J., Oguchi, M. E., Bronfman, F. C., Fukuda, M. & Gonzalez-Billault, C. (2016) Rab35 functions in axon elongation are regulated by p53-related protein kinase (PRPK) in a mechanism that involves Rab35 protein degradation and the microtubule-associated protein 1B. *J. Neurosci.* 36, 7298-7313 (査読あり)  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.4064-15.2016
- ⑭ Homma, Y. & Fukuda, M. (2016) Rabin8 regulates neurite outgrowth in both GEF-activity-dependent and -independent manners. *Mol. Biol. Cell* 27, 2107-2118 (査読あり)  
doi: 10.1091/mbc.E16-02-0091
- ⑮ Marubashi, S., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2016) A Varp-binding protein, RACK1, regulates dendrite outgrowth through stabilization of Varp protein in mouse melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 136, 1672-1680 (査読あり)  
doi: 10.1016/j.jid.2016.03.034
- ⑯ Mrozowska, P. S. & Fukuda, M. (2016) Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in 2D and 3D epithelial cell cultures. *J. Cell Biol.* 213, 355-369 (査読あり)  
doi: 10.1083/jcb.201512024
- ⑰ Efergan, A., Azouz, N. P., Klein, O., Noguchi, K., Rothenberg, M. E., Fukuda, M. & Sagi-Eisenberg, R. (2016) Rab12 regulates retrograde transport of mast cell secretory granules by interacting with the RILP-dynein complex. *J. Immunol.* 196, 1091-1101 (査読あり)  
doi: 10.4049/jimmunol.1500731
- ⑱ Marubashi, S., Shimada, H., Fukuda, M. & Ohbayashi, N. (2016) RUTBC1 functions as a GTPase-activating protein for Rab32/38 and regulates melanogenic enzyme trafficking in melanocytes. *J. Biol. Chem.* 291, 1427-1440 (査読あり)  
doi: 10.1074/jbc.M115.684043
- ⑲ Mori, Y. & Fukuda, M. (2015) Assay of Rab17 and its guanine nucleotide exchange factor Rabex-5 in the dendrites of hippocampal neurons. *Methods Mol. Biol.* 1298, 233-243 (査読あり)  
doi: 10.1007/978-1-4939-2569-8\_20
- ⑳ Kobayashi, H., Etoh, K., Marubashi, S., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2015) Measurement of Rab35 activity with the GTP-Rab35 trapper RBD35. *Methods Mol. Biol.* 1298, 207-216 (査読あり)  
doi: 10.1007/978-1-4939-2569-8\_18
- ㉑ Aizawa, M. & Fukuda, M. (2015) Small GTPase Rab2B and its specific binding protein Golgi-associated Rab2B interactor-like 4 (GARI-L4) regulate Golgi morphology. *J. Biol. Chem.* 290, 22250-22261 (査読あり)  
doi: 10.1074/jbc.M115.669242
- [学会発表] (計 18 件)
- ① Kan Etoh & Mitsunori Fukuda  
The small GTPase Rab10 regulates the formation of tubular endosomes.  
The 2017 ASCB/EMBO meeting (Philadelphia, PA) December 4, 2017
- ② Mitsunori Fukuda  
Rab small GTPases are key players for neurite outgrowth and differentiation.  
Seminar in the National Center of Neurology and Psychiatry (Kodaira, Japan) September 14, 2017
- ③ 小口舞、野口憲太、福田光則  
神経突起伸長を負に制御する新規低分子量 G タンパク質 Rab の探索  
第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台) 2017 年 6 月 13 日
- ④ 小口舞、野口憲太、福田光則  
リサイクリングエンドソームに局在する新規 Rab11 結合タンパク質 TBC1D12 は神経突起伸長を制御する  
第 39 回日本分日本生化学会東北支部 第 83 回例会 (仙台) 2017 年 5 月 27 日
- ⑤ 福田光則  
Rab8/10 活性化因子・Rabin8 による神経突起伸長の制御メカニズム  
第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム「メンブレントラフィック研究の新時代」(横浜) 2016 年 11 月 30 日
- ⑥ 小口舞、野口憲太、福田光則  
リサイクリングエンドソームに局在する新規 Rab11 結合タンパク質 TBC1D12 の機能解析  
第 89 回日本生化学会大会 (仙台) 2016 年 9 月 27 日
- ⑦ 福田光則  
細胞外環境に依存した Rab ファミリーによ

る上皮細胞極性輸送の制御  
第 89 回日本生化学会大会シンポジウム「膜動態を介した細胞間・細胞外環境との相互作用の制御」(仙台) 2016 年 9 月 25 日

⑧ Mitsunori Fukuda

Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in epithelial cells.

2016 FASEB Science Research Conference “GTPases in Trafficking, Autophagy and Disease” (West Palm Beach, FL, USA) September 21, 2016

⑨ Paulina S. Mrozowska & Mitsunori Fukuda

Rab12 regulates podocalyxin exit from early endosomes through tubulation of endosomal membranes.

2016 FASEB Science Research Conference “GTPases in Trafficking, Autophagy and Disease” (West Palm Beach, FL, USA) September 20, 2016

⑩ 小口舞、野口憲太、福田光則

リサイクリングエンドソームに局在する新規 Rab11 結合タンパク質 TBC1D12 の同定  
第 68 回日本細胞生物学会大会 (京都) 2016 年 6 月 17 日

⑪ 衛藤貫、福田光則

Rab35 活性化因子 DENND1A/connecdenn 1 は神経突起伸長を制御する  
第 68 回日本細胞生物学会大会 (京都) 2016 年 6 月 16 日

⑫ 福田光則

上皮細胞のポドカリキシン極性輸送における Rab シグナリングネットワークの解析  
第 68 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「高次生命機能を司るメンブレントラフィック：分子基盤からその破綻による疾患発症の理解に向けて」(京都) 2016 年 6 月 15 日

⑬ Paulina S. Mrozowska & Mitsunori Fukuda

Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in 2D and 3D epithelial cell cultures.

2016 Gordon Research Conference “Cell Polarity and Signaling” (West Dover, VT, USA) June 13-17, 2016

⑭ 福田光則

細胞内小胞輸送が制御する多彩な生命現象～メラニン輸送、オートファジー、ヒスタミン分泌まで～  
第 40 回皮膚科免疫セミナー (東京) 2016 年 3 月 5 日

⑮ 福田光則

神経突起伸長における Rab シグナリングカスケードの役割

第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ「高次生命機能を支えるメンブレントラフィック」(神戸) 2015 年 12 月 3 日

⑯ 本間悠太、福田光則

神経突起伸長における Rabin8 の機能解析  
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2015 年 12 月 1 日

⑰ 衛藤貫、福田光則

Rab35-centaurin-β2/ACAP2 複合体の形成による神経突起伸長及び細胞質分裂の制御  
第 67 回日本細胞生物学会大会 (東京) 2015 年 6 月 30 日

⑱ Mitsunori Fukuda

Rab small GTPases, key players in melanosome movements and neurite outgrowth.

2015 Departmental Seminar Series at the Pasteur Institute (Paris, France) June 8, 2015

[図書] (計 2 件)

① Fukuda, M. (2018) Slp (synaptotagmin-like protein) Encyclopedia of Signaling Molecules 2nd Edition (Choi, S. ed.) pp. 5041-5047, Springer, Berlin Heidelberg, Germany ISBN: 978-1-4939-6799-5

② Oguchi, M. E. & Fukuda, M. (2018) Rab27 Encyclopedia of Signaling Molecules 2nd Edition (Choi, S. ed.) pp. 4378-4385, Springer, Berlin Heidelberg, Germany ISBN: 978-1-4939-6799-5

[その他]

東北大学・生命科学研究所・膜輸送機構解析分野・ホームページ

<https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail.html?id=1724>

6. 研究組織

福田 光則 (FUKUDA MITSUNORI)

東北大学・生命科学研究所・教授

研究者番号：50311361

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし