

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11日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370087

研究課題名（和文） Rab33による小胞輸送制御機構の解明

研究課題名（英文） Study on the role of Rab33 in membrane trafficking

研究代表者

福田 光則 (FUKUDA MITSUNORI)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：50311361

研究成果の概要（和文）：低分子量G蛋白質Rab33は、脊椎動物に広く保存され、何らかの特異的な膜輸送過程を制御するものと考えられているが、これまでその役割は明らかではなかった。本研究では、活性化型のRab33に特異的に結合するエフェクター分子としてAtg16LやRUFY2/3などを新規に同定することにより、オートファゴソームの成熟過程の制御や神経機能への関連性を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Small GTPase Rab33 is mostly conserved in vertebrates and has been suggested to be involved in specific membrane trafficking events, although its precise role remained to be determined. In this study, we identified Atg16L and RUFY2/3 as novel GTP-Rab33-specific binding proteins and demonstrated the possible involvement of Rab33 in the regulation of autophagosomal maturation and neuronal function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：Rab33、エフェクター、膜輸送、Atg16L1、オートファジー、低分子量G蛋白質、オルガネラ、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

低分子量G蛋白質Rabは真核生物に普遍的に保存された膜（小胞あるいはオルガネラ）輸送の制御因子で、Rasスーパーファミリーの中で最大のファミリーを形成している。出芽酵母では11種類、線虫・ショウジョウバエでは約30種類のRabアイソフォームが存在するのに対し、ヒトやマウスでは60種類以上のRabアイソフォームがゲノム上に存在することから、高等動物の高度に特殊化した

組織・細胞での複雑化した膜輸送との関連性が示唆されている。本研究課題の対象であるRab33は脊椎動物に広く保存されており（マウスの場合にはRab33A/Bの二種類）、脊椎動物に特異的な何らかの膜輸送過程を制御するものと考えられる。一般的に、Rabの膜輸送における役割を解明するためには、その下流の因子である特異的なエフェクター分子（活性化型のGTP-Rabに結合する分子）の同定とその機能解析が不可欠である。従って、

Rab33 についても特異的なエフェクター分子の同定・機能解析が不可欠と考えられるが、これまでその詳細は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、Rab33 に特異的に結合するエフェクター分子群をまずスクリーニングし、同定した分子の機能解析を通して、Rab33 が制御する膜輸送過程（生命現象）の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 活性化型固定化 Rab33 (Rab33A/B) を bait に用いて、酵母 two-hybrid 法によるスクリーニング及び GST-Rab33 プルダウン法により各種細胞抽出液から Rab33 結合蛋白質の単離を行った。後者の GST プルダウン法により得られた結合分子の同定は、質量分析により行った。また、Rab パネル (Rab の網羅的解析ツール) を用いて、同定された結合分子が実際に活性化型の Rab33 にのみ特異的に結合するのかを検証した。

(2) 同定された Rab33 結合分子の Rab33 結合部位を同定するため、PCR 法により各種欠失変異体を作成し、酵母 two-hybrid 法や COS-7 細胞を用いた共免疫沈降実験により結合を評価した。

(3) Rab33 の膜輸送における機能を明らかにするためには、その時空間的制御基盤 (活性化酵素・不活性化酵素) を明らかにすることが重要である。本研究では、Rab の不活性化に関与する TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) ドメインを含む分子 (TBC 蛋白質) に注目し、Rab33 を特異的に不活性化する TBC 蛋白質 (Rab33-GAP) を網羅的にスクリーニングした。具体的には、ヒトに存在する 40 種類の TBC 蛋白質に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を付加したものを一つずつマウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) に発現させ、オートファゴソーム形成に対する影響を検討した (LC3 のドット形成を免疫染色により評価)。また、このスクリーニングで得られた候補 TBC タンパク質が *in vitro* で実際に GAP 活性を示すのかを検討した。

4. 研究成果

(1) 活性化型固定化 Rab33 を bait にした酵母 two-hybrid スクリーニング及び GST-Rab33 プルダウン実験を行い、Rab33 結合タンパク質として、RUFY2/3 (RUN and FYVE domain containing 2/3) 及び Atg16L1/2 (autophagy-related 16-like 1/2) を同定することに成功した。RUFY3 は Singar1 と呼ばれ、神経細胞の軸索形成への関与が示唆されており、また Atg16L1 はオートファゴソ-

ムの前駆体である隔離膜形成に必須の因子として知られている。Rab パネルを用いた Rab 結合特異性の検討の結果、RUFY3 及び Atg16L1/2 は活性化型の Rab33 特異的に結合したが、RUFY2 は Rab33 以外にも Rab4 や Rab6 といった他のアイソフォームとの結合も観察された (図 1)。

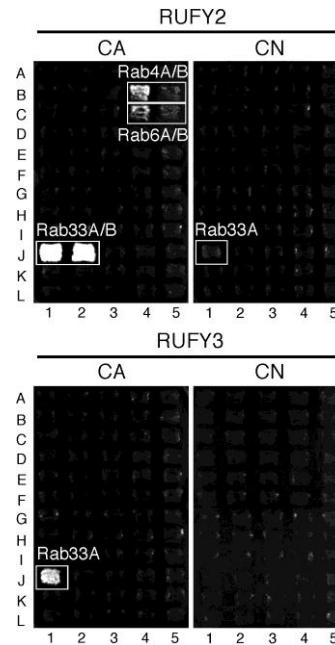


図 1 RUFY2/3 の Rab 結合特異性 (CA/CN, constitutive active/negative 変異体)

(2) RUFY2/3 及び Atg16L1/2 の各種欠失変異体を作成し、Rab33 結合部位の絞り込みを行った。その結果、RUFY2/3 では、二つあるコイルド-コイル領域のアミノ末端側 (CC1) で Rab33 を結合することが明らかとなった (図 2)。興味深いことに、RUFY2 では CC1 とは異なる領域で Rab4 や Rab6 と結合し、デュアルエフェクターとして機能する可能性が示唆された。Atg16L1/2 についても同様に、

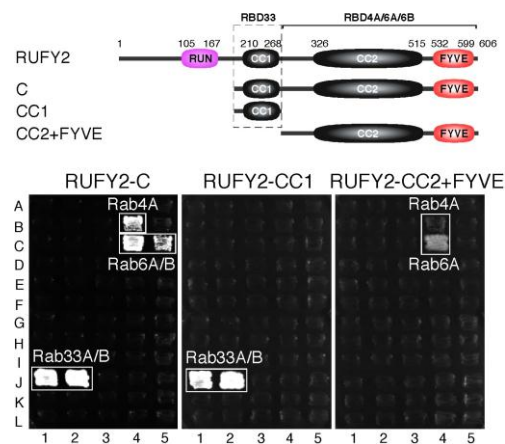


図 2 RUFY2 の Rab33 結合部位の同定

Atg16L1/2 の中央部分に存在するコイルドコイル領域を介して Rab33 と結合することが明らかとなった。しかし、Atg16L2 の Rab33 結合能は、Atg16L1 と比較してかなり弱いものであった。Atg16L1 のコイルドコイル領域を MEF 細胞などに過剰発現させると、オートファジーが顕著に阻害されることから、Rab33 のオートファジー（自食作用）制御への関与が示唆された。

(3) LC3 のドット形成を指標として、ヒトに存在する 40 種類の TBC 蛋白質を網羅的にスクリーニングした結果、LC3 のドットが顕著に減少するような TBC タンパク質を得ることは出来なかった。しかし、予想に反して、LC3 陽性のオートファゴソームに局在する TBC タンパク質が複数存在することが明らかとなった（図 3 上段）。例えば、OATL1 (TBC1D25 とも呼ばれる) は、細胞外の栄養が豊富な条件下では細胞質中に存在するが、飢餓条件下では LC3 陽性のオートファゴソームにリクルートするという非常に興味深い挙動を示した（図 3 下段）。

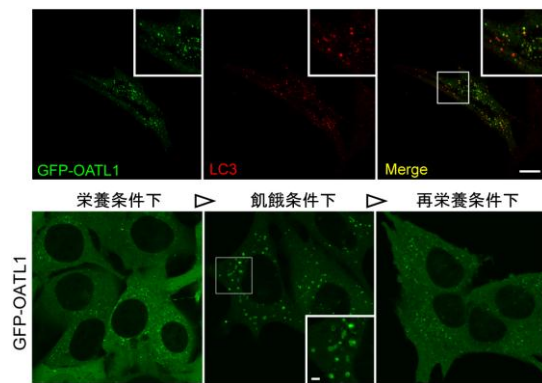


図 3 OATL1 のオートファゴソームへの局在

OATL1 のオートファゴソームへの局在化のメカニズムを探るため、そのアミノ酸配列を詳細に検討した結果、p62 などの LC3 結合タンパク質で既に明らかになっている LC3 認識配列に類似した配列 (SPLEDWDIISPDKDVI) を有することが明らかとなった。実際、点突然変異体を用いた解析から、OATL1 はこの配列を介して、直接 LC3 と結合することによりオートファゴソーム上に局在することが確認できた。また、OATL1 のオートファジーへの影響を詳細に検討した結果、OATL1 を過剰に発現する細胞では、オートファゴソームの成熟、すなわち形成されたオートファゴソームとリソソームが融合し分解される過程が顕著に遅くなっていることが判明した。この成熟の遅延には TBC ドメインによる GAP 活性が不可欠で、GAP 活性に必須のアルギニン残基をリジンに置換した RK 変異体ではオートファゴソームの成熟遅延は観察されなかった。

さらに、OATL1 の基質を *in vitro* GAP アッセイにより探索した結果、Rab33 が特異的なターゲットであることを突き止めた（図 4）。

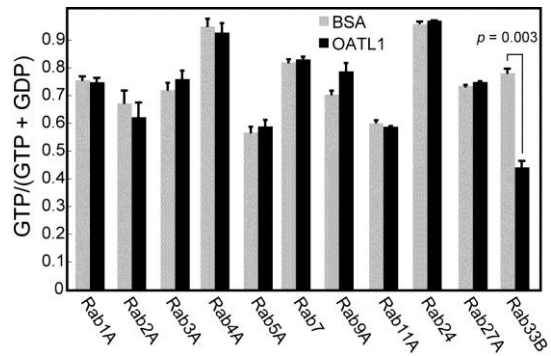


図 4 OATL1 の Rab33-GAP 活性

Rab33 の GTPase 活性を欠損させた QL 変異体の過剰発現でも同様なオートファゴソームの成熟遅延が観察されたことから、オートファゴソームとリソソームの融合過程には Rab33 の GTP 加水分解活性が重要と考えられる。(1)で上述したように、Rab33 はオートファジー必須の因子 Atg16L1 と特異的に結合することから、図 5 に示すような Rab33、Atg16L1 (Rab33 effector)、OATL1 (Rab33-GAP) によるオートファジー制御モデルが想定される。

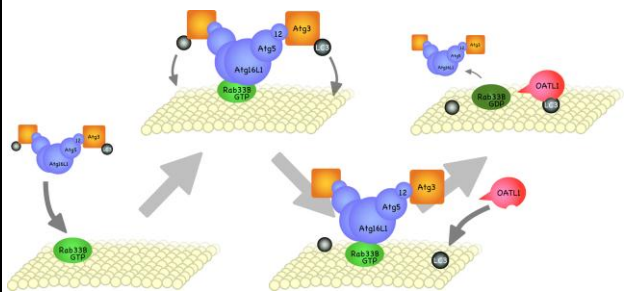


図 5 Rab33-Atg16L1-OATL1 によるオートファジー制御モデル

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 6 件)

- ① Ishibashi, K., Fujita, N., Kanno, E., Omori, H., Yoshimori, T., Itoh, T. & Fukuda, M. (2011) Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. *Autophagy* 7, 1500-1513 査読有
- ② Itoh, T. & Fukuda, M. (2011) A possible

role of Atg8 homologues as a scaffold for signal transduction. *Autophagy* 7, 1080-1081 査読有

- ③ Fukuda, M., Kobayashi, H., Ishibashi, K. & 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 査読有
- ④ Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S. & Fukuda, M. (2011) OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J. Cell Biol.* 192, 839-853 査読有
- ⑤ Fukuda, M. (2011) TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci. Rep.* 31, 159-168 査読有
- ⑥ Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H., Matsui, T., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2010) Comprehensive screening for novel Rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic* 11, 491-507 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 福田光則: Rab の網羅的解析ツールを用いた新規膜輸送経路の探索と新たな Rab 機能の同定. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム「メンブレントラフィック研究の最近のトレンド (低分子量 GTPase による多彩な制御機構)」(京都) 2011 年 9 月 24 日
- ② 伊藤敬、菅野栄子、植村武文、和栗聡、福田光則: オートファジーに關与する Rab-GAP の探索. 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 8 日
- ① 福田光則: オートファジー制御に關与する低分子量 GTPase Rab の機能解析. 第 82 回日本生化学会大会シンポジウム「低分子量 GTPase から眺めるメンブレントラフィック研究の新展開」(神戸) 2009 年 10 月 23 日

[その他]

ホームページ等

http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/field_list/membrane_trafficking/t_fukuda

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 光則 (FUKUDA MITSUNORI)
東北大学・大学院生命科学研究所・教授
研究者番号: 50311361

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし