

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 14日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590065

研究課題名（和文） GTP結合蛋白質 Rab32によるオートファジーの分子調節機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular mechanism of autophagy by GTP-binding protein Rab32

研究代表者

田中 嘉孝（TANAKA YOSHITAKA）

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：20217095

研究成果の概要（和文）：オートファジーは細胞内の異常タンパク質の除去、抗がん作用および病原体侵入に対する防御機構等に関与する主要な細胞内タンパク質分解システムである。申請者らは、小胞輸送に関与する低分子量 GTPase である Rab32 が、オートファゴソーム形成とタンパク質凝集体のオートファジーによる除去に関与することを見出した。さらに、本研究は、これまで明らかにされていなかったオートファゴソーム膜の由来が小胞体膜であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Autophagy is a major intracellular protein degradation system involved in eliminating aberrant protein aggregates, protecting against tumors, and defending against pathogen invasion. Here we show that a small GTPase, Rab32, is a novel protein required for the formation of autophagic vacuoles and regulates the clearance of aggregated proteins by autophagy. Although there is a long-standing debate concerning from where the autophagosomal membrane is derived, we found that Rab32 facilitates the formation of autophagic vacuoles whose membranes are derived from the ER and regulates the clearance of aggregated proteins by autophagy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：オートファジー、リソソーム、タンパク質分解、GTP結合タンパク質、Rab32

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内の異常タンパク質蓄積の除去、抗がん作用、抗病原体侵入作用といった多様な疾病のメカニズムに抜本的に関わる細胞内の防御作用として、予防医療という観点から近年、注目を浴びている研究分野である。さらに、過食の時代といわれる昨今、飢餓時の生体応答のメカニズムを解明することで生活習慣病の予防及び治療に

つながることも期待されている。オートファジーは生体が飢餓状態に曝された際に誘導される生体防御機構であるが、同時に、細胞構成成分を少しずつ分解し、生命維持に必要な不可欠な代謝回転に寄与しているため、生理機構として定常状態においても行われている現象である。これまで、オートファジーによる物質分解の主な細胞内小器官であるオートファゴソームの形成に関わる遺伝子と

して *ATG* 遺伝子群が同定され、その機能解析が行われてきた。しかしながら、オートファゴソームの“基”である隔離膜の由来については明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまで、オートファジーに関する研究は主に *Atg* 関連タンパク質の機能解析を中心として行われてきた。本研究は *Rab* タンパク質という膜輸送の制御因子に着目しオートファジーの制御機構の解明を目的としたものである。オートファゴソームの成熟に関連するタンパク質として *Rab7*、*Rab24* が報告されているが、オートファゴソームの発生そのものに関与する *Rab* タンパク質はこれまで報告されていない。

そこで申請者らは小胞体への *Rab32* の局在がオートファゴソームの形成に必要な不可欠である想定し、*Rab32* とともに小胞体膜にリクルートされオートファゴソームの膜形成に共役して関与するタンパク質の同定及びそれら蛋白質の制御機構の解明を行うことにより、オートファゴソーム形成の分子制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、*Rab32* とともにオートファゴソームの膜形成に共役して関与するタンパク質の同定及びその分子機構の解明を目的にしている。申請者らがこれまで行ってきた実験結果から、*Rab32* と相互作用し共役してオートファジーに関与するタンパク質として、先述した通り *AKAP1* 及び *Beclin 1* がある。そこで以下のような実験を計画した。

(1) これら2種のタンパク質と *Rab32* との相互作用について、*Yeast two-hybrid* や *GST* タンパク質を用いた *pull-down assay* 等の *in vitro* 実験、免疫沈降法などの *in vivo* 実験を行う。

(2) 機能解析に発展させるため各タンパク質の変異体・欠失体を用いて相互作用ドメインを特定する。

(3) 相互作用タンパク質のノックダウン時のオートファゴソームの形成について、またその時の *Rab32* の機能について解析する。

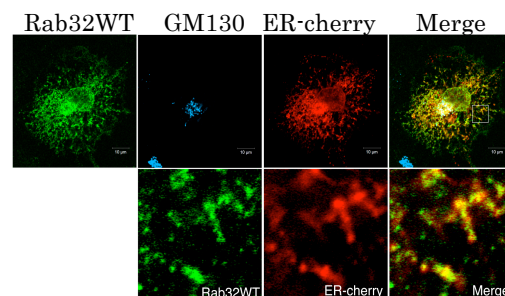
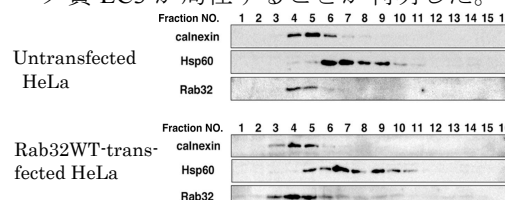
(4) 相互作用とオートファジー機能の関連について特に以下の点について詳細な検討を行う。

- ① *Rab32* 及び相互作用するタンパク質の小胞体へのリクルートメントがオートファゴソームの形成に関与するか否か。
- ② それらの相互作用は *PtdIns 3-kinase* 活性に依存するか否か、また *PtdIns 3-kinase* 活性と比例してオートファゴソームの形成は引き起こされるか否か。

- ③ 相互作用を阻害した際にオートファジーの機能破綻により異常タンパク質の蓄積等の生体レベルで観察される症状が生じているか否か細胞レベルで検討する。

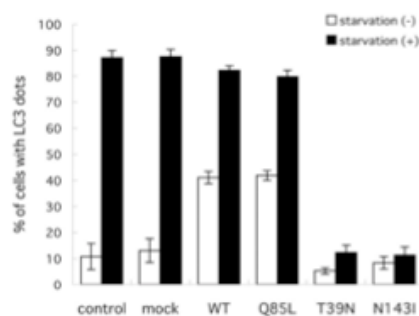
4. 研究成果

(1) 低分子量 GTP 結合型タンパク質 *Rab32* 野生型 (WT) の発現により、小胞体タンパク質カルネキシンを有する小胞が出現し、その小胞にはオートファゴソームのマーカータンパク質 *LC3* が局在することが判明した。



(2) *Rab32* の膜への結合に必要な残基を欠失させた時、オートファジーは飢餓時にも誘導されなかったことから、オートファゴソームの形成には *Rab32* の小胞体膜への局在が必要であることが明らかになった。

(3) 不活性型 *Rab32* の発現時や siRNA を用いた内在性 *Rab32* のノックダウン時に、飢餓状態や rapamycin 等オートファジー誘導薬物で培養した際にも、オートファゴソームが形成されず、ユビキチン化タンパク質の凝集体 (aggresome 様コンパートメント) が形成されたことから、オートファゴソームの形成は *Rab32* の活性に依存し、*Rab32* は定常状態で行われるオートファジー制御機構に関与することが示唆された。



- (4) Rab32 とともに小胞体膜にリクルートされ、オートファゴソーム膜の形成に関与するタンパク質として A-kinase anchoring protein 1 (AKAP1) およびオートファジー関連タンパク質として知られている Beclin-1 を同定した。
- (5) Rab32 と AKAP1 および Beclin-1 が相互作用することを *in vitro* および細胞レベルの実験により明らかにした。
- (6) RNAi 法によるノックダウン実験により、Rab32 と AKAP1 および Beclin-1 が共役してオートファゴソーム形成を制御することに加え、PtdIns 3-kinase (hVps34) が Rab32 と Beclin-1 の相互作用を調節することが判明した。
- (7) AKAP1、Beclin-1 および hVps34 の小胞体膜へのリクルートメントは、GTP 結合型 Rab32 の発現に依存した。
- (8) 不活性型 Rab32 (Rab32T39N および Rab32N143I) によるオートファゴソーム形成阻害は、これら AKAP1、Beclin-1 および hVps34 の aggresome 様構造物への局在変化により引き起こされることが判明した。
- (9) 本研究から得られた成果は、オートファジー研究の主要なテーマの 1 つであるオートファゴソーム膜の由来に関して小胞体の可能性を明確に示し、Rab32 が主要な役割を果たすことが明らかとなった。

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 12 件)

- ① Fujita H., Fujimoto K., Tokunaga K., and Tanaka Y. Intracellular logistics of BST-2/tetherin. *Curr. HIV Res.* (2012) in press、査読有
- ② Tachiyama R., Ishikawa D., Matsumoto M., Nakayama K.-I., Yoshimori T., Yokota S., Himeno M., Tanaka Y., and Fujita H. Proteome of ubiquitin/MVB pathway: possible involvement of iron-induced ubiquitylation of transferrin receptor in lysosomal degradation. *Genes Cells* 16, 448 – 466, (2011) 、査読有
- ③ Fujita H., Hongo M., Mochizuki M., Yokoyama K., and Tanaka Y. Inhibitory effects of 16-hydroxy-9-oxo-10E,12E,14E-octadecatrienoic acid (Corchorifatty acid B) isolated from *Melissa officinalis* Linne on melanogenesis. *Exp. Dermatol.*, 20, 420 – 424, (2011) 、査読有
- ④ Amano J., Masuyama N., Hirota Y., Tanaka Y., Igawa Y., Shiokawa R., Okutani T., Miyayama T., Nanami M., and Ishigai M. Antigen-dependent internalization is related to rapid elimination from plasma of humanized anti-HM1.24 monoclonal antibody (AHM). *Drug Metab. Dispos.*, 38, 2339 – 2346, (2010) 、査読有
- ⑤ Iwabu Y., Kinomoto M., Tatsumi M., Fujita H., Shimura M., Tanaka Y., Ishizaka Y., Nolan D., Mallal S., Sata T., and Tokunaga K. Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J. Biol. Chem.*, 285, 35350 – 35358, (2010) 、査読有
- ⑥ Iwabu Y., Fujita H., Tanaka Y., Sata T., and Tokunaga K. Direct internalization of cell- surface BST-2/tetherin by HIV-1 accessory protein Vpu. *Commun. Integr. Biol.*, 3, 366 – 369, (2010) 、査読有
- ⑦ Ozono C., Etoh S., Matsumoto M., Nakayama K., Hirota Y., Tanaka Y., and Fujita H. Nedd4-interacting protein 2, a short half-life membrane protein degraded in lysosomes, negatively controls down-regulation of connexin43. *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 951 – 957, (2010) 、査読有
- ⑧ Iwabu Y., Fujita H., Kinomoto M., Kaneko K., Ishizaka Y., Tanaka Y., Sata T., and Tokunaga K. HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J. Biol. Chem.*, 284, 35060 – 35072, (2009) 、査読有
- ⑨ Masuyama N., Kuronita T., Tanaka R., Muto T., Hirota Y., Takigawa A., Fujita H., Aso Y., Amano J., and Tanaka Y. HM1.24 is internalized from lipid rafts by clathrin-mediated endocytosis through interaction with alpha-adaptin. *J. Biol. Chem.*, 284, 15927 – 15941, (2009) 、査読有
- ⑩ Hirota Y. and Tanaka Y. A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66, 2913 – 2932, (2009) 、査読有
- ⑪ Kashiwayama Y., Seki M., Yasui A., Murasaki Y., Morita M., Yamashita Y., Sakaguchi M., Tanaka Y., and Imanaka T. 70-kDa peroxisomal membrane protein related protein (P70R/ABCD4) localizes to endoplasmic reticulum not peroxisomes, and NH₂-terminal hydrophobic property determines the subcellular localization of

- ABC subfamily D proteins. *Exp. Cell Res.*, 315, 190 – 205, (2009)、査読有
- ⑫ Fujita H., Motokawa T., Katagiri T., Yokota S., Yamamoto A., Himeno M., and Tanaka Y. Inulavosin, a novel melanogenesis inhibitor, leads to mistargeting of tyrosinase to lysosomes and accelerates its degradation. *J. Investig. Dermatol.*, 129, 1489 – 1499, (2009)、査読有
- 〔学会発表〕(計 16 件)
- ① 藤本 景子、吉永 奈央、平井 祥一、廣田 有子、静川 直子、藤田 英明、田中 嘉孝、「Trans-Golgi network 膜タンパク質 TGN46 の細胞内輸送および局在化の分子制御機構」、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都
- ② 藤田 英明、岩部 幸枝、佐多 徹太郎、徳永 研三、田中 嘉孝、「膜結合型ユビキチンリガーゼ MARCH8 によるトランスフェリン受容体のユビキチン化およびダウンレギュレーションの分子機構」、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都
- ③ 廣田 有子、藤本 景子、栗原 俊祐、阿佐 絵里佳、池田 一彦、佐野 孝一、神吉 将之、関 二郎、藤田 英明、田中 嘉孝、「薬物誘発性リン脂質症の分子機構に関する研究」、第 27 回 日本薬学会九州支部大会、2010 年 12 月 12 日、長崎
- ④ 藤本 景子、吉永 奈央、平井 祥一、廣田 有子、静川 直子、藤田 英明、田中 嘉孝、「Trans-Golgi network 膜タンパク質 TGN46 の細胞内輸送および局在化の分子制御機構に関する研究」、第 27 回 日本薬学会九州支部大会、2010 年 12 月 11 日、長崎
- ⑤ 藤田 英明、立山 諒、松本 雅記、中山 敬一、吉森 保、姫野 勝、横田 貞記、田中 嘉孝、「鉄濃度依存的なトランスフェリン受容体のユビキチン化による代謝回転制御に関する研究」、第 27 回 日本薬学会九州支部大会、2010 年 12 月 12 日、長崎
- ⑥ 岩部 幸枝、藤田 英明、田中 嘉孝、佐多 徹太郎、徳永 研三、「BST-2/tetherin の downregulation における HIV-1 Vpu の cofactor 要求性」、BMB2010 (第 83 回日本生化学会大会/第 33 回日本分子生物学会年会)、2010 年 12 月 7 日、神戸
- ⑦ Hideaki Fujita, Yukie Iwabu, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Keiko Fujimoto, Ryo Tachiyama, Daisuke Ishikawa, Masaki Matsumoto, Keiichi Nakayama, and Yoshitaka Tanaka, 「The endosomal vesicles carrying ubiquitylated cargos selectively localizes to the cleavage furrow during cytokinesis」, BMB2010 (第 83 回日本生化学会大会/第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ⑧ Hideaki Fujita, Yukie Iwabu, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Keiko Fujimoto, Ryo Tachiyama, Daisuke Ishikawa, Masaki Matsumoto, Keiichi Nakayama, and Yoshitaka Tanaka, 「Targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow requires ubiquitylation of membrane proteins」, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY Special Symposium “BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY OF ESCRTS IN HEALTH AND DISEASE”, 2010 年 10 月 15 日、Utah USA
- ⑨ 徳永 研三、岩部 幸枝、藤田 英明、田中 嘉孝、佐多 徹太郎、「HIV-1 Vpu による細胞表面 BST-2/tetherin の直接的な internalization」、第 58 回日本ウイルス学会、2010 年 11 月 7 日、徳島
- ⑩ 岩部 幸枝、藤田 英明、田中 嘉孝、佐多 徹太郎、徳永 研三、「HIV-1 Vpu による BST-2/tetherin の機能阻害に関与する cofactor の検索」、第 58 回日本ウイルス学会、2010 年 11 月 7 日、徳島
- ⑪ Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga, 「Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by HIV-1 Vpu」, Centennial Retrovirus Meeting, 2010 年 5 月 24 日, Cold Spring Harbor USA
- ⑫ Maya Hongo, Hideaki Fujita, Maya Mochizuki, Tomomi Kato, Kouji Yokoyama, Yoshitaka Tanaka, 「Inhibitory effect of active compound isolated from *Melissa officinalis* Linné (Labiatae) on melanogenesis and phagocytosis」, 日本研究皮膚科学会 第 34 回年次学術大会・総会、2009 年 12 月 4 日、福岡
- ⑬ Yuko Hirota, Yoshitaka Tanaka, 「A small GTPase, human Rab32, is required for the formation of autophagic vacuoles under basal conditions」, The 5th International Symposium on Autophagy, 2009 年 9 月 25 日、大津
- ⑭ 藤田 英明、立山 諒、石川 大輔、松本 雅記、中山 敬一、横田 貞記、吉森 保、姫野 勝、田中 嘉孝、「過剰遊離鉄依存的なトランスフェリン受容体のユビキチン化がリソソームでのダウンレギュレーションを引き起こす」、

第82回 日本生化学会大会、 2009年10月21日、神戸

- ⑮ 岩部 幸枝、藤田 英明、石坂 幸人、田中 嘉孝、佐多 徹太郎、徳永 研三、「HIV-1 Vpu によるウイルス放出抑制因子 BST-2/Tetherin の細胞内分解経路の解明」、第57回日本ウイルス学会、2009年10月25日、東京
- ⑯ 岩部 幸枝、藤田 英明、石坂 幸人、田中 嘉孝、佐多 徹太郎、徳永 研三、「HIV-1 Vpu と BST-2/Tetherin の Transmembrane 領域間における相互作用」、第57回日本ウイルス学会、2009年10月25日、東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://saisei.phar.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 嘉孝 (TANAKA YOSHITAKA)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：20217095

(2) 研究協力者

廣田 有子 (HIROTA YUKO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：50588259

藤本 景子 (FUJIMOTO KEIKO)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：00634198