

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14692

研究課題名(和文) 低分子量Gタンパク質Rab6による可溶性分泌タンパク質の輸送機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of soluble protein secretion regulated by a small GTPase Rab6

研究代表者

本間 悠太 (Homma, Yuta)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70812642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低分子量Gタンパク質であるRab6の機能解析を行った。Rab6欠損細胞においては、膜タンパク質の細胞表面の量には大きな差がみられなかったが、その輸送速度は半減していた。また、細胞外基質成分を始めとした、様々な可溶性分泌タンパク質の分泌が顕著に阻害されていた。これらの分泌されなかったタンパク質は、小胞体からゴルジ体へは正常に輸送されていたが、その後リソソームへ異所的に運ばれていた。これらの結果から、Rab6はゴルジ体以降の分泌経路を制御していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分泌経路は、神経伝達物質やインスリンなどを始め、様々なタンパク質を細胞外(または細胞膜)へと運ぶための主要な輸送経路である。本研究では、低分子量Gタンパク質Rab6がゴルジ体以降の分泌経路を制御することを明らかにしたことで、細胞の基本的な生命現象の一つである分泌経路の全容解明に一歩近づき、また分泌経路に関連する疾患の病態理解などにもつながることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the function of a small GTPase Rab6 in the secretory pathway. The total amount of surface transmembrane proteins was not severely affected in Rab6-knockout cells, but their transport efficiency was reduced. Secretion of soluble proteins, including extracellular matrix components, was strongly inhibited in Rab6-knockout cells. These unsecreted proteins were normally transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus, but mistargeted to lysosomes after exit from the Golgi apparatus. These results indicate that Rab6 regulates the post-Golgi transport in the secretory pathway.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞輸送 分泌経路 Rab

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は絶えず分泌(エキソサイトーシス)と取り込み(エンドサイトーシス)によって外環境との物質のやり取りを行い、動的な恒常性を維持している。これらの物質の交通を支えるのが細胞内小胞輸送システムであり、その中心的な制御因子として、低分子量 G タンパク質 Rab が知られている。哺乳類には 60 以上の Rab 遺伝子が存在し、それぞれの Rab が、モーター分子や膜係留・融合因子などと結合して様々な小胞輸送経路を制御する。Rab 遺伝子の機能を包括的に理解するため、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により、全 Rab 遺伝子のノックアウト(KO)細胞コレクションを作製した。これらの細胞を解析する中で、Rab6 のノックアウト細胞(Rab6-KO 細胞)が細胞外基質を全く分泌できていないことを発見した。分泌経路は、ホルモンや細胞外基質などの可溶性分泌タンパク質、および細胞表面で機能する膜タンパク質が小胞体で合成された後、ゴルジ体を経由して細胞外に輸送される経路である。各オルガネラ間の輸送は小胞を介して行われるが、小胞輸送の各ステップに Rab6 がどう関与しているかの詳細は不明であった。

### 2. 研究の目的

分泌経路における Rab6 の機能を明らかにすること。特に、Rab6 が膜タンパク質の輸送よりも、可溶性分泌タンパク質の輸送に必要であるという可能性を検証すること。

### 3. 研究の方法

細胞は、イヌ腎臓上皮由来の MDCK 細胞を用いた。野生型細胞と、CRISPR-Cas9 により作製した Rab6-KO 細胞(クローン番号#7 および#39)を用いて、下記のアッセイを行った。

#### (1) 細胞外に分泌されたタンパク質の解析

細胞を無血清培地で培養した後に培地を回収し、真空凍結乾燥により濃縮した後、ゲルろ過によって脱塩した。このサンプルを、SDS-PAGE の後、銀染色またはウェスタンブロッティング(WB)により解析した。また、同位体ラベルによる定量質量分析(Filgen 社に依頼)により、含まれるタンパク質を網羅的に同定・定量した。

#### (2) モデル分泌分子の解析

可溶性分泌タンパク質のモデルとして、シグナルペプチドを付加した EGFP(ss-EGFP)を細胞に発現させ、培地に放出された EGFP を免疫沈降により回収して WB により定量した。また膜タンパク質のモデルとして、FM4 ドメイン(薬剤の添加により小胞体からの輸送を同調的に開始できる)と膜貫通領域を付加した ss-EGFP(ss-EGFP-FM4-TMD)を細胞に発現させ、細胞表面への輸送を免疫染色により解析した。さらに、細胞表面をビオチン化して可溶化した後にストレプトアビジンで沈降することで、細胞表面の ss-EGFP-FM4-TMD を回収して WB で定量した。

ss-EGFP 発現細胞にシクロヘキシミド(タンパク質合成阻害剤)を処理し、ss-EGFP の輸送運命を追跡した(チェイス実験)。また、ss-EGFP 発現細胞にパフィロマイシン A1(リソソーム阻害剤)を処理し、リソソームに運ばれた EGFP の分解と消光を防ぐことでこれを可視化した。

### 4. 研究成果

これまでに、Rab6-KO 細胞において細胞外基質の分泌が阻害されていることを明らかにしていたが、この分泌不全が細胞外基質に限ったものなのか、より広い分泌タンパク質に影響があるのかを調べるため、細胞外に分泌された総タンパク質を回収し、SDS-PAGE の後、銀染色を行った。その結果、多くのバンドが Rab6-KO 細胞由来のサンプルにおいて減少していることが明らかとなった。また、MMP9 や clusterin に対する抗体を用いて WB を行い、これらのタンパク質の分泌量が減少していることを確かめた。さらに、分泌された総タンパク質を定量質量分析により解析した。同定されたタンパク質のうち、シグナルペプチドを有する典型的な分泌タンパク質は Rab6-KO 細胞において分泌量が軒並み減少していた。これらの結果から、Rab6-KO 細胞においては、細胞外基質のみならず、可溶性分泌タンパク質全般の分泌が阻害されていると考えられた。この一般化をさらに進めるため、特異的な輸送シグナルを持たないモデル分泌分子として、ss-EGFP を用いた分泌アッセイを行った。細胞外に分泌された EGFP の量を調べると、Rab6-KO 細胞では野生型細胞に比べて 25%程度まで減少していた(図 1)。

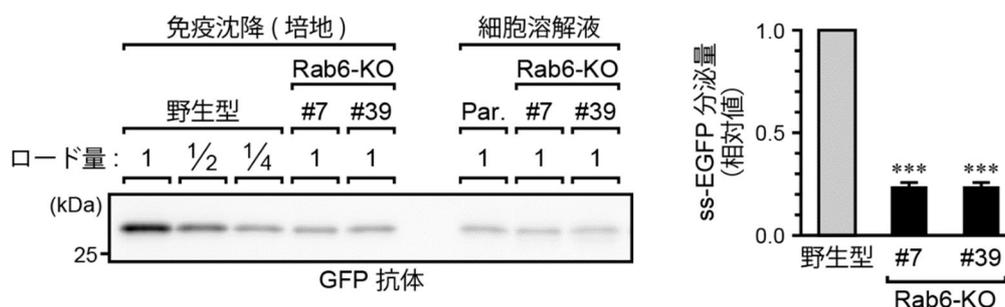


図 1 . 可溶性分子(ss-EGFP)の分泌アッセイ

一方で、Rab6-KO 細胞において、定常的な膜タンパク質の量には大きな差がみられなかったことから、Rab6 は膜タンパク質の輸送にはほとんど関与しないと予想された。そこで、膜タンパク質の輸送に対する影響を評価するため、ss-EGFP-FM4-TMD を膜タンパク質のモデル分子として用いた。これを発現させた細胞において、細胞表面への輸送を免疫染色及び WB により解析したところ、Rab6-KO 細胞においてはその輸送が半分程度まで減少していることが明らかとなった (図 2)。

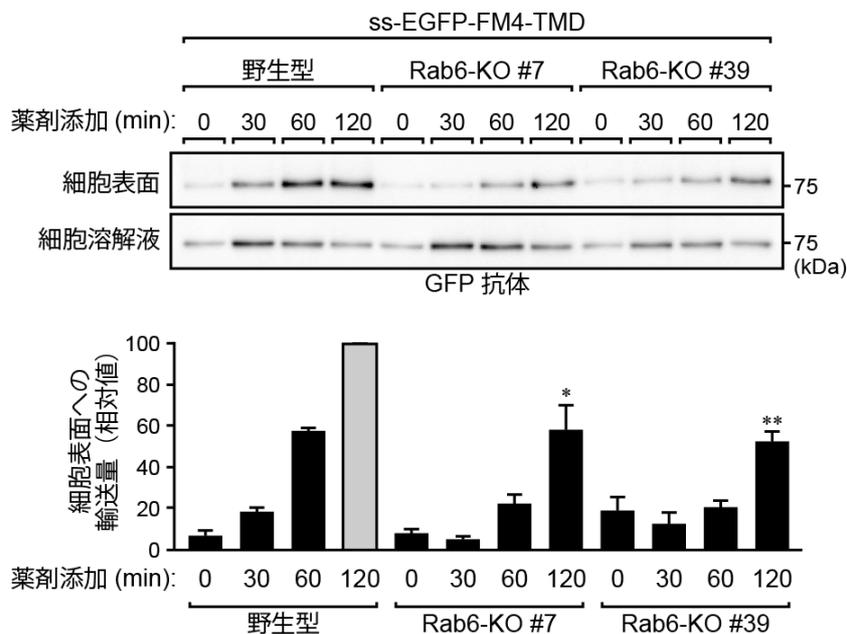


図 2 . 膜タンパク質 ( ss-EGFP-FM4-TMD ) の分泌アッセイ

これらの結果から、当初想定していた「膜タンパク質は可溶性タンパク質とは別の小胞により、Rab6 非依存的に輸送される」という仮説は強くは支持されないことが明らかとなったので、さらなる検証は見送った。代わりに、Rab6 が分泌経路のどの段階に関与しているのか、また、どのようなメカニズムで機能するのかに焦点を当てて、以降の解析を行った。

まず、ss-EGFP の輸送過程を追跡するため、シクロヘキシミド処理によるチェイス実験を行った。もし Rab6-KO 細胞において特定のオルガネラにおける小胞輸送が阻害されているならば、野生型細胞と比較してそのオルガネラでの ss-EGFP の蓄積が観察されるはずである。しかし意外なことに、シクロヘキシミド処理をした Rab6-KO 細胞においても、細胞内の ss-EGFP の蛍光は野生型細胞と同程度の時間で消失した。しかしながら、Rab6-KO 細胞においては ss-EGFP は細胞外には分泌されていないはずなので、代わりにリソソームで分解されて消失している可能性を考えた。これを検証するために、細胞にパフィロマイシン A1 を処理すると、野生型細胞では ss-EGFP はリソソームには全く観察されないのに対して、Rab6-KO 細胞においては顕著に蓄積する様子が観察された (図 3) 。このことから、Rab6 はゴルジ体を出芽した後の小胞が、細胞膜へと適切にターゲットされるのに必要であり、Rab6-KO 細胞においては、正しく運ばれず分泌されなかったタンパク質が、リソソームで分解されてしまうと考えられた。

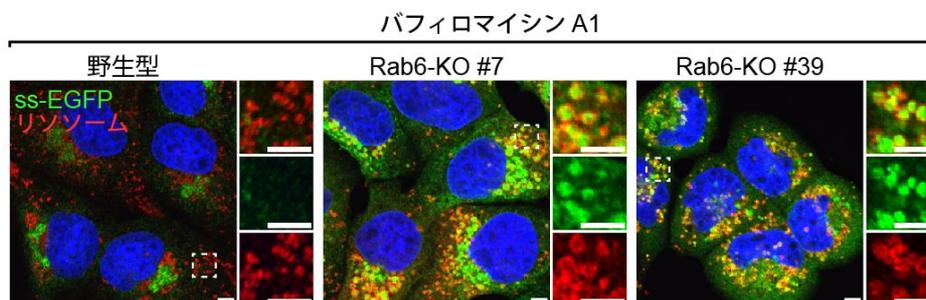


図 3 . Rab6-KO 細胞において ss-EGFP はリソソームに運ばれる

Rab の具体的な機能を知るためには、その特異的な結合分子 ( エフェクター ) を同定することが重要である。これまでに、Rab6 のエフェクターとして ELKS1/2 および Bicaudal-D1/2 などが知られていたことから、CRISPR-Cas9 によりこれらの KO 細胞を作製した。しかし意外なことに、どちらの KO 細胞についても、Rab6-KO 細胞で見られていた細胞外基質の形成不全がみられなかった。従って、分泌経路における Rab6 の機能には別のエフェクター ( 未知のものを含む ) の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Homma Yuta, Kinoshita Riko, Kuchitsu Yoshihiko, Wawro Paulina S., Marubashi Soujiro, Oguchi Mai E., Ishida Morie, Fujita Naonobu, Fukuda Mitsunori	4. 巻 218
2. 論文標題 Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 2035 ~ 2050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201810134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kinoshita Riko, Homma Yuta, Fukuda Mitsunori	4. 巻 295
2. 論文標題 Rab35-GEFs, DENND1A and folliculin differentially regulate podocalyxin trafficking in two- and three-dimensional epithelial cell cultures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3652 ~ 3663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuta Homma, Riko Kinoshita, Yoshihiko Kuchitsu, Paulina Wawro, Soujiro Marubashi, Mai Oguchi, Morie Ishida, Naonobu Fujita, and Mitsunori Fukuda
2. 発表標題 Comprehensive knockout analysis of the Rab family small GTPases in MDCK cells
3. 学会等名 ASCB EMBO 2018 meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Homma, Riko Kinoshita, Yoshihiko Kuchitsu, Paulina Wawro, Soujiro Marubashi, Mai Oguchi, Morie Ishida, Naonobu Fujita, and Mitsunori Fukuda
2. 発表標題 Comprehensive knockout analysis of the Rab family small GTPases in epithelial cells
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----