

平成21年 4月 7日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2007～2008
課題番号：19790242
研究課題名 (和文) Griscelli 症候群原因遺伝子 Rab27A の活性化制御メカニズムの解明
研究課題名 (英文) Analysis of regulation of Rab27A responsible for human inheritance disease Griscelli syndrome.
研究代表者
伊藤 敬 (Takashi Itoh)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：50373270

研究成果の概要：

Griscelli 症候群原因遺伝子である Rab27A は EPI64 と呼ばれる酵素によって不活性化される。今回、EPI64 を含む TBC1D10 ファミリー (EPI64, FLJ13130, mFLJ00332) の機能の比較を行うことで、FLJ13130 と mFLJ00332 が EPI64 とは異なる機能を持つことを明らかにでき、本申請の目的であった、EPI64 の制御メカニズム解明の基礎的なデータを得ることが出来た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学：色素細胞：色素小胞：Rab27A：メラノサイト：メラノソーム：リソソーム関連オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

Griscelli 症候群は、皮膚や毛髪の色素異常、免疫不全などの症状を示す重篤なヒト遺伝病である。ヒトの皮膚や毛髪の色素化は、色素細胞（メラノサイト）中で合成されたメラニン色素が色素胞（メラノソーム）と呼ばれる小胞の中に貯蔵され、皮膚の角質化細胞や毛髪の毛母細胞に受け渡され蓄積することによって起こる現象である。Griscelli 症候群では、白子症（アルビノ）とは異なりメラニン色素を合成することはできるが色素細胞内における輸送に異常があることが分かっていた。近年、低分子量 G 蛋白質のひとつである Rab27A がその原因遺伝子であることが明らかになってから (Ménasché, G. *et al.* (2000) *Nat. Genet.* 25, 173-176)、Griscelli 症候群発症メカニズムの解明に向けた分子レベルでの研究が世界中で行われてきた。その中であって、当研究室では Slac2-a と命名した蛋白質が、Rab27A のエフェクター (Rab27A の活性化型に特異的に結合し共に機能する蛋白質) であることを同定した。そして、Slac2-a がメラノソームに局在する Rab27A と、アクチン線維上を走るミオシン Va 蛋白質とを結びつけることで、ミオシン Va の動力をメラノソームに伝えメラニン色素輸送を行っていることを明らかにし、Griscelli 症候群の色素異常発症メカニズムを世界に先駆けて解明することに成功している (Fukuda, M. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 12432-12436)。

Rab27A 活性調節の中で、不活性化は GAP (GTPase-activating protein) によって行なわれていると考えられているが、Rab27A に関してはこれまで GAP が同定されていなかった。申請者は、色素細胞内での Rab27A の不活性化がメラノソーム輸送を阻害することに着目し、ヒトゲノム上に存在

する Rab-GAP/TBC 蛋白質を網羅的にスクリーニングすることで、Rab27A の GAP (Rab27A-GAP) を世界で初めて同定することに成功した (Itoh, T. & Fukuda, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281(42):31823-31831.)。

2. 研究の目的

Rab27-GAP である EPI64 はヒトやマウスなどのほ乳類のゲノム中では FLJ13130, mFLJ00332 と共に、TBC タンパク質ファミリーの中の一つのサブファミリー (TBC1D10 ファミリー) を形成している。これらのタンパク質は構造上極めて似ており、その GAP 活性に必須な TBC ドメインにおいては、EPI64-FLJ13130 間で 81%, FLJ13130-mFLJ00332 間で 59%, mFLJ00332-EPI64 間で 60% という、高い相同性を示すため、機能的にも類似していると考えられた。しかしながら、申請者のこれまでの解析により、FLJ13130 は EPI64 と同様にメラノソーム輸送に影響を及ぼすことが確認されたが、mFLJ00332 はメラノソーム輸送には関与しないことが明らかになっていた。このことから、EPI64, FLJ13130, mFLJ00332 が Rab27 とは異なる Rab を標的とし、メラノソーム輸送以外の細胞内膜輸送メカニズムを制御している可能性が考えられた。そこで、三者の個別の機能の探求を目的に、三者が制御する膜輸送メカニズムを明らかにすること試みた。

3. 研究の方法

3.1 免疫沈降

T7 タグや FLAG タグを融合した目的タンパク質を発現するベクターを構築、アカゲザル由来の COS-7 細胞に導入することでタンパク質

を発現させた。細胞抽出液から、T7 タグを認識する抗体が付加されたアガロースビーズにより T7 タグ付きタンパク質を沈降させ、同時に FLAG タグ付きタンパク質が沈降してくるかどうかでタンパク質同士の結合の有無を評価した。

3.2 細胞観察

EGFP や mRFP を融合した目的タンパク質を発現するベクターを構築、melan-a, PC12, Jurkat 細胞に導入した。細胞をパラフォルムアルデヒドで固定後、Rab3, Rab27 への特異的抗体で染色を行ない、共焦点顕微鏡にて観察を行なった。

3.3 in vitro GAP assay

大腸菌用発現ベクターに Rab 遺伝子を導入したベクターを構築。Rab タンパク質を大腸菌から精製して用いた。TBC タンパク質は COS-7 細胞に発現させたものを精製して用いた。Rab タンパク質に放射性ラベルされた GTP ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$) を結合させ、その後 TBC タンパク質と反応させた。反応後の GTP/GDP の量比を TLC 展開を行なうことで定量し、GAP 活性の有無を評価した。

4. 研究成果

4.1 TBC1D10B/FLJ13130

Rab3A は Rab27A と近縁の Rab であり、一次構造や局在などが他の Rab と比べて非常に似ている。しかしながら、Rab3A に関しては TBC タンパク質に属する GAP が同定されていなかった。そこで、EPI64 を同定したものと同様の手法を用いて、Rab3A に対する GAP の同定を試みた。副腎髄質クロマフィン細胞由来の PC12 細胞では、Rab3A は細胞突起先端の小胞上に局在し、ホルモン分泌を制御している。Rab3A に活性を持つ TBC タンパク質を過剰発現させることで、この Rab3A の局在が失われるものがあれば、その TBC タンパク質は Rab3A

の GAP であると考えられる。実際にスクリーニングを行なった結果、FLJ13130 の発現により Rab3A の局在が失われることが明らかになった。興味深いことに mFLJ00332 は若干の活性を持つものの、EPI64 の発現では Rab3A の局在は全く影響を受けなかった。In vitro GAP assay の結果、FLJ13130 は弱いものの Rab3A への GAP 活性を示した (図 1)。しかしながら他の Rab (Rab22A, Rab27A, Rab35) にも活性を示し、上記した Rab27A への活性がもっとも強かった。FLJ13130 は EPI64 や mFLJ00332 (後述) と異なり、かなり緩い特異性を持った酵素であると考えられ、更に色素細胞とは異なる細胞でも機能していることが示唆された (*Genes Cells. (2009) 14(1):41-52.*)。

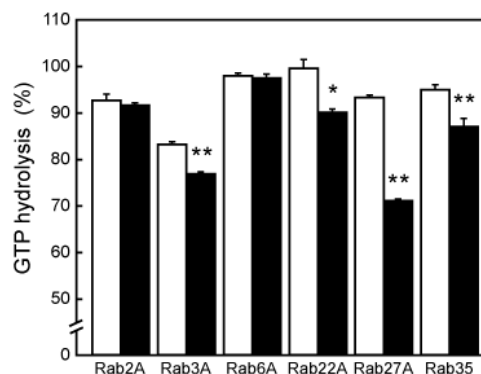


図 1
FLJ13130 による in vitro GAP assay の結果を示している。Rab27A にももっとも強く、Rab3A, Rab22A, Rab35 に対しても若干の GAP 活性を示した。

4.2 mFLJ00332

ヒトを病気から守る免疫システムのなかで、T 細胞と抗原提示細胞とが形成する免疫シナプスは T 細胞が抗原を認識する過程で重要な役割を果たしている。この免疫シナプスを形成するためには極性に従った膜輸送が必要となるが、それに関わる Rab や Rab-GAP はまだ同定されていなかった。mFLJ00332 は末梢

血 T 細胞に豊富に発現しており、その候補と考えられた。また、mFLJ00332 の標的を同定するため、mFLJ00332 と共局在を示す Rab を探索したところ、Rab35 がもっとも強く共局在する Rab だと同定され、実際、mFLJ00332 が Rab35 に GAP 活性を持つことを明らかにすることが出来た。またこの時、mFLJ00332 は Rab3A や Rab27A には GAP 活性を示さなかった (図 2)。更に、mFLJ00332 やドミナントネガティブ型の Rab35 の発現や mFLJ00332 のノックダウンによって、免疫シナプスの形成が著しく阻害され、同時に、リサイクリング経路の機能障害、極性を持った TCR (T Cell Receptor) の輸送に異常を示したことから、Rab35 と mFLJ00332 は T 細胞においてリサイクリング経路を制御することで免疫シナプスの形成に寄与していると考えられた (*J. Biol. Chem.* (2008) 283:18323-18330.)。

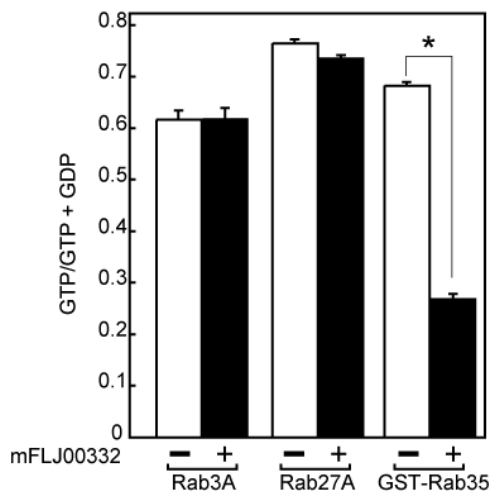


図 2
mFLJ00332 による in vitro GAP assay の結果を示している。Rab35 に対してのみ、GAP 活性を示した。

以上の結果から、TBC1D10 ファミリーに属する EPI64, FLJ13130, mFLJ00332 が、その高い相同性にも関わらず、標的となる Rab が異なり、機能する膜輸送イベントも異なってい

ることが示された。相同性が高いにも関わらず、基質が異なることは、保存されていない領域に基質認識部位が存在することを示唆しており、TBC-Rab の基質特異性を知る上で興味深い結果だと考えている。今後、立体構造解析などにより、TBC-Rab の認識がどのように行なわれているかが明らかになると考えている。

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 3 件)

1. Ishibashi, K., Kanno, E., Itoh, T., and Fukuda, M.
Identification and characterization of a novel Tre-2/Bub2/Cdc16 (TBC) protein that possesses Rab3A-GAP activity.
Genes Cells. (2009) 14(1):41-52.
査読あり
2. 伊藤敬、福田光則
低分子量 GTPase Rab とエフェクター蛋白質 核酸 酵素 (2008) 53(16)
2065-2070
査読なし
3. Patino-Lopez, G., Dong, X., Ben-Aissa, K., Bernot, K. M., Itoh, T., Fukuda, M., Kruhlak, M. J., Samelson, L. E., and Shaw, S.
Rab35 and its GAP EPI64C in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation.
J. Biol. Chem. (2008)

283(26):18323-18330.

査読あり

[学会発表] (計 1 件)

1. 石橋弘太郎、菅野栄子、伊藤敬、福田光

則

TBC ドメインを含む新規 Rab3A-GAP のスクリーニング

第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回

日本生化学会大会 合同大会

(2007.12.13 横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 敬 (Takashi Itoh)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 50373270

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし