

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06653

研究課題名(和文)色素細胞における低分子量Gタンパク質Arf6の機能解明

研究課題名(英文)Physiological function of Arf6 in melanocytes

研究代表者

大林 典彦 (Ohbayashi, Norihiko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：40421979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Arf6KD色素細胞では、FSKやIBMXにより色素細胞樹状突起形成伸長が有意に減少したことから、Arf6による色素細胞樹状突起形成には、cAMPにより制御されるシグナルが重要であると考えられた。多くのRabタンパク質とArf6-GAPsとの結合能をin vitroで解析したところ、いくつかの新しいRabとArf6-GAPの結合を見出すことに成功した。色素細胞に発現が認められるACAP1を色素細胞に過剰発現させると、IBMX処理非依存的に色素細胞が樹状突起を伸長させた。これはACAP1によるArf6の活性化調節が、色素細胞活性化における細胞内シグナル伝達系の下流に位置することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

色素細胞におけるメラノソーム形成や輸送過程には、多くのRab低分子量Gタンパク質の重要性が報告されてきている。しかしながら、Rabと共に小胞輸送を調節するArf低分子量Gタンパク質の色素細胞での生理機能については、いまだ不明な点が多い。本研究は、Arfの中でもArf6およびArf6-GAPであるACAP1がcAMP依存的に色素細胞の樹状突起伸長に関与することを突き止めたもので、「RabとACAP1の新たな相互作用と色素細胞樹状突起伸長機構の詳細」を今後明らかにすることが、色素細胞活性化の総合的理解やシミそばかす予防への新たな対応策構築へとつながる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：FSK and IBMX inhibited the extension of dendritic growth in Arf6-KD melanocytes, implying that cAMP-regulated signals are necessary for Arf6-induced melanocytic dendrite formation. We investigated the capacity of several Rab proteins to bind to Arf6-GAPs in vitro and discovered numerous new Rab binding with Arf6-GAPs. The overexpression of ACAP1, expressed in melanocytes, promoted dendritic elongation irrespective of IBMX therapy in melanocytes, which shows that ACAP1 regulates Arf6 activation downstream of the melanocytic activation of the intracellular signaling pathway.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞輸送 色素細胞 メラニン 低分子量Gタンパク質 樹状突起

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メラニンは、有害な紫外線から細胞を守るために重要な役割を果たすが、その一方で、ケラチノサイトにおける過剰なメラニンの沈着はしみやそばかすの原因ともなり、メラニン量を適切に制御することは生活の品質向上に不可欠である。メラニンは、表皮基底層に存在する色素細胞においてメラノソームと呼ばれる特殊なオルガネラ内で合成・貯蔵されている。そして、色素細胞は樹状突起を伸長させ、隣接するケラチノサイトや毛母細胞とシナプスを形成することで、これらの細胞にメラニンを受け渡し、皮膚や毛髪が暗色化する。

これら一連の過程には、低分子量 G タンパク質である Rab の機能解析が進んできている。Rab32/Rab38 が調節するメラニン合成酵素輸送によるメラノソーム形成成熟機構、Rab27A によるアクチンフィラメント上のメラノソーム輸送機構、Rab36 による微小管上のメラノソーム逆行性輸送、Rab1A による微小管上のメラノソーム順行性輸送、Rab21 による色素細胞の樹状突起形成機構など、多くの Rab 分子により制御されることが明らかになっている。一方、Rab とともに小胞輸送を調節することで知られる低分子量 G タンパク質として Arf ファミリーがあるが、これまでのところ、Arf が調節する色素細胞の生理機能についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究は、小胞輸送調節やアクチン骨格再編成などに関わる低分子量 G タンパク質 Arf6 に着目し、色素細胞における Arf6 の生理機能を細胞レベル・個体レベルで解析することで、未だ理解が進んでいない色素細胞の樹状突起形成過程を解明し、色素細胞における小胞輸送機構の包括的理解を目的とした。

3. 研究の方法

Arf ファミリーは6種類のメンバーからなり、アミノ酸配列の相同性によりクラス1～3の3つのクラスに分類される。Arf6 は唯一クラス3に属する Arf であり独特の機能を有する。すなわち、活性化型 Arf6 は、そのエフェクターであるホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP5K) やホスホリパーゼ D などに上流からのシグナルを伝え、エンドサイトーシスやアクチン骨格再編成等を促進する。これらの機能の多くは細胞レベルでの研究成果であるが、近年、Arf6 コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析により、個体レベルでの Arf6 の機能が明らかになりつつある。

1) 本研究では、tamoxifen に反応する性質をもった ERT2 を色素細胞特異的な tyrosinase プロモーターにつないだトランスジェニックマウス (TYR-CreERT2) と Arf6 flox マウスとを交配して得られた TYR-CreERT2::Arf6 flox/flox を作出し、その解析を試みた

2) 色素細胞における細胞レベルでの Arf6 の機能を解析するため、Arf6 ノックダウン処理した色素細胞に見出される異常について検討を行った。

4. 研究成果

Arf6 ノックダウン色素細胞では、フォルスコリンあるいは 1-メチル-3-イソブチルキサンチン (IBMX) などの様々なホスホジエステラーゼ阻害剤処理による色素細胞内 cAMP レベルを上昇させる処理により生じる、色素細胞樹状突起形成伸長が有意に減少することが観察された(図1)。Arf6 による色素細胞樹状突起形成には、cAMP により制御されるシグナルが重要であると考えられた。

Arf と Rab はともに小胞輸送制御に関わる重要な低分子量 G タンパク質群を形成する。Arf の活性化を調節する GTPase-activating protein (GAP) のいくつかの分子と Rab は直接的に相互作用し、協調して機能することが報告されており、本研究は、Arf6-GAP と Rab 分子との相互作用を検討する方向へと転換した。多くの GST-Rab タンパク質と Arf6-GAPs との結合能を *in vitro* で解析したところ、いくつかの新しい Rab と Arf6-GAP の結合を見出した。色素細胞における発現を RT-PCR で検討したところ、Arf6-GAP のなかでも ACAP1 発現を有意に認めたことから、ACAP1 を色素細胞に発現させると、興味深いことに、IBMX 処理非依存的に色素細胞が樹状突起を伸長

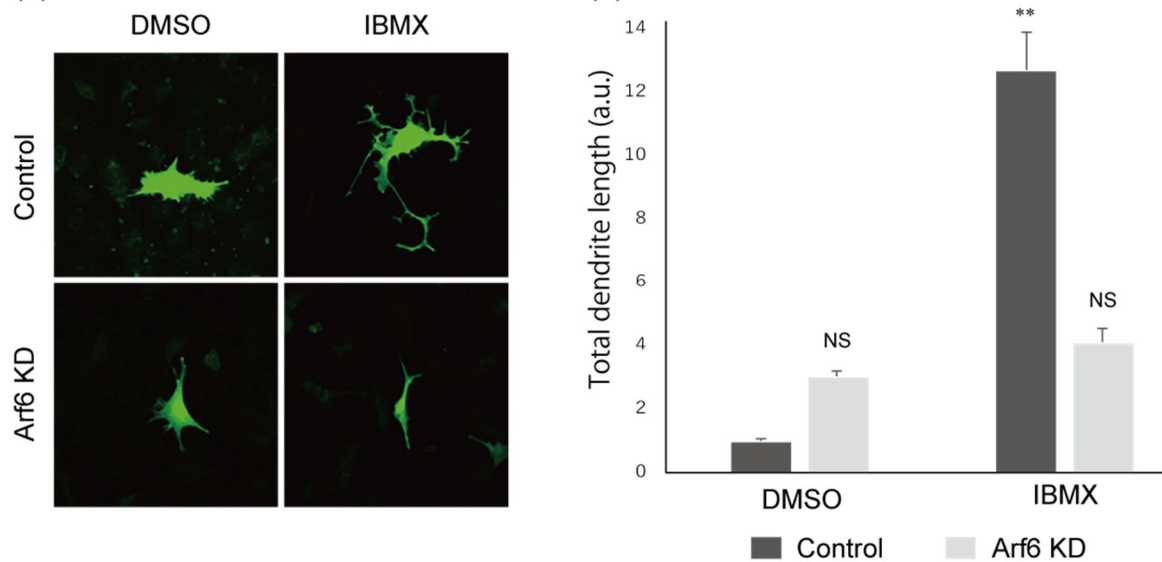


図1 Arf6 ノックダウンによるメラノサイトの樹状突起形成

(A) IBMX 処理によりメラノサイトの樹状突起形成を誘導した際のコントロール群 (上段) と Arf6 ノックダウン群 (下段) の樹状突起形成の様子を観察し、(B) 各群 30 細胞の樹状突起長を定量した。*: $p < 0.05$

させた (図2)。これは、ACAP1 による Arf6 の活性化制御が、色素細胞活性化による細胞内シグナル伝達系の下流に位置することを示唆するものである。今後は、Rab と ACAP1 の新たな相互作用と色素細胞樹状突起活性化機構の詳細を突き止めることが、色素細胞活性化の総合的な理解につながるものと考えられる。

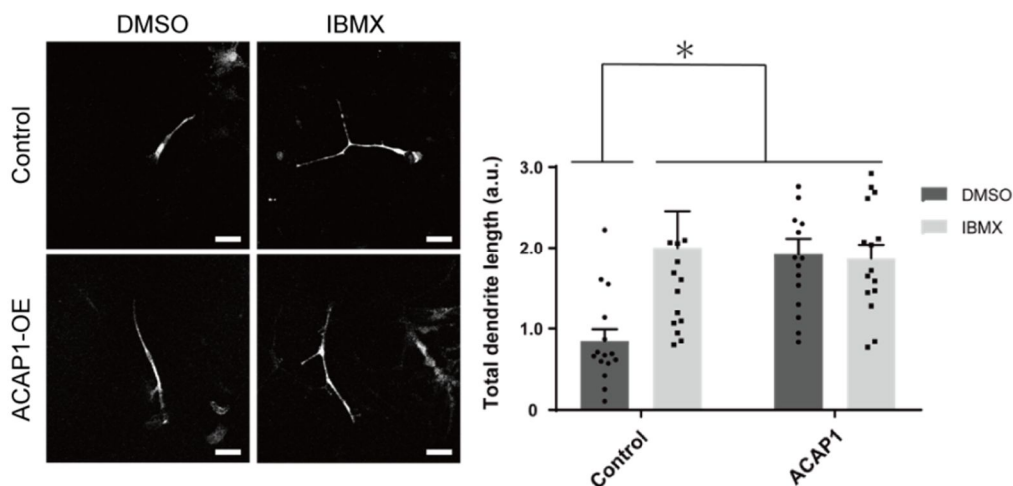


図2. ACAP1過剰発現によるメラノサイトの樹状突起形成

(A) IBMXによって樹状突起形成を誘導した際のコントロール群 (上段) ACAP1過剰発現群 (下段) の樹状突起形成の様子を観察し、(B) 各群30細胞の樹状突起長を定量した。*: $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Dolce Luciano G., Ohbayashi Norihiko, Silva Daniel F.C. da, Ferrari Allan J.R., Pirolla Renan A.S., Schwarzer Ana C. de A.P., Zanphorlin Leticia M., Cabral Lucelia, Fioramonte Mariana, Ramos Carlos H.I., Gozzo Fabio Cesar, Fukuda Mitsunori, Giuseppe Priscila O. de, Murakami Mario T.	4. 巻 212
2. 論文標題 Unveiling the interaction between the molecular motor Myosin Vc and the small GTPase Rab3A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Proteomics	6. 最初と最後の頁 103549 ~ 103549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jprot.2019.103549	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 該当する
1. 著者名 Kim Nguyen Nguyen Thi, Ohbayashi Norihiko, Kanaho Yasunori, Funakoshi Yuji	4. 巻 528
2. 論文標題 TBC1D24 regulates recycling of clathrin-independent cargo proteins mediated by tubular recycling endosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 220 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.007	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 Ohbayashi Norihiko, Fukuda Mitsunori	4. 巻 9
2. 論文標題 Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 608 ~ 608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12688/f1000research.24625.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Toshiki, Minami Setsuya, Tsuchiya Yugo, Tajima Kazu, Sakai Natsumi, Suga Kei, Hisanaga Shin ichi, Ohbayashi Norihiko, Fukuda Mitsunori, Kawahara Hiroyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Cytoplasmic control of Rab family small GTPases through BAG6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e46794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201846794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大林典彦
2. 発表標題 小胞輸送が司るメラノソーム形成機構
3. 学会等名 第29回日本色素細胞学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanaho Yasunori; 船越祐司; Nguyen Nguyen Thi Kim; 大林典彦
2. 発表標題 Ubiquitin-specific protease TRE17/USP6 promotes cancer cell invasion through the regulation of CD147 recycling.
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kanaho Yasunori; 船越祐司; 小倉由希乃; 大林典彦
2. 発表標題 脱ユビキチン化酵素TRE17/USP6は、膜蛋白質の輸送を介して癌細胞浸潤能を亢進する。
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大林典彦、田島佳寿、高橋俊樹、福田光則、川原裕之
2. 発表標題 BAG6によるメラニン合成酵素輸送因子Rab32/38の新規制御機構
3. 学会等名 第30回日本色素細胞学会学術大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------