

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15062

研究課題名（和文）Rabタンパク質代謝を介した新規メンブレントラフィック制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of Membrane Trafficking via Rab Protein Proteolysis

研究代表者

高橋 俊樹（Takahashi, Toshiki）

東京都立大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：50897353

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：申請者が本事業によって行った申請研究によって、これまで明らかになっていなかったRabタンパク質の分解メカニズムやRab分解によっておこる細胞機能への影響が明らかになり、細胞内輸送機構-メンブレントラフィック研究の新領域を切り開いた。本申請研究の成果は日本生化学会本会やタンパク質分解のエキスパートが集う新学術領域「ケモテクノロジーが拓くユビキチンニューフロンティア」の研究会でも発表し、一定の評価を得ている。また、細胞生物学分野で評価の高いcell誌系列の学術雑誌「iScience」にも採択、掲載され、他研究者からもその内容を引用されるなど高い評価を得ている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究では、細胞内の主要輸送経路であるメンブレントラフィック研究の新機軸を開拓することを目的とし、これまで着目されていなかった輸送制御因子の分解に焦点を当てた。研究の結果、これまで安定であると考えられていた制御因子Rabタンパク質が特定の条件下で分解されること、Rab分解を介してメンブレントラフィックが制御されていることを明らかにし、これまでと異なる研究領域の創出に繋がった。本申請研究を進展させていくことで様々なヒト疾患に関わっているといわれるメンブレントラフィックの基礎メカニズムの解明につながり、医療を含めた社会基盤の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The submitted research results have revealed the degradation mechanism of Rab proteins and the effects of Rab degradation on cellular functions, which had not been clarified before, and have opened up a new field of intracellular transport mechanism-membrane traffic research. The results of this research have been presented at meetings of the Japanese Biochemical Society and the New Academic Frontier in Chemotechnology “Ubiquitin New Frontier” where experts in proteolysis gather, and have received a certain amount of recognition. It has also been adopted and published in iScience, an academic journal affiliated with the highly regarded cell journal in the field of cell biology, and has received high acclaim, with its contents cited by other researchers.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Rabタンパク質 ユビキチン メンブレントラフィック

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞内では、膜小胞による輸送ネットワーク(メンブレントラフィック)が構築されており、その膜動態制御は、細胞恒常性の維持に不可欠である。低分子量 GTPase である Rab タンパク質は、GTP 型と GDP 型をサイクルすることで小胞輸送を制御することが知られており、その動態解析はメンブレントラフィックの分子機構解明に繋がる。申請者はこれまでに、Rab アイソフォームの一つである Rab8a を用いて、細胞内で安定に存在すると考えられていた Rab タンパク質が GDP との結合依存的に急速に分解されていることを世界で初めて発見した (Takahashi, T. et al., EMBO Rep., 2019)。しかし、その特異的な分解のメカニズムや生理的な意義は未だわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、いまだ明らかでない Rab 分解メカニズムに関わる細胞内因子やその生理的意義を明らかにし、Rab の量的制御を介した新たなメンブレントラフィック制御系の提案を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト細胞モデルである培養細胞への遺伝子導入技術を用いて GDP 型 Rab タンパク質を細胞内で発現させ、その動態を解析することで、GDP 型特異的な Rab 認識・分解メカニズム及び細胞内における Rab 分解機構の意義を明らかにした。具体的には、以下の項目に焦点を当て、GDP 結合型 Rab タンパク質の分解メカニズムにアプローチした。

- (1) GDP 型 Rab8a の特異的認識機構の解明
- (2) GDP 型 Rab8a のユビキチン修飾、分解誘導因子の探索
- (3) Rab8a 機能に対するプレエンブティブ品質管理依存的 GDP-Rab 分解の意義解明

4. 研究成果

本研究の結果、これまで安定であると考えられていた制御因子 Rab タンパク質が特定の条件下で分解されること、Rab 分解を介してメンブレントラフィックが制御されていることを明らかにし、これまでと異なる研究領域の創出に繋がった。

- (1) BAG6 を中心としたプレエンブティブ品質管理因子は GDP 型 Rab タンパク質を特異的に認識する

低分子量 GTPase である Rab タンパク質は、細胞内で GTP 結合型と GDP 結合型が混在しており、GDP 結合型の Rab を分解する際には特異的な認識機構が働くと考えられる。申請者は GDP 結合型 Rab 分解の鍵となるその認識機構を解明すべく、インタラクトームデータベースを利用して、不良な膜タンパク質の分解に関わるプレエンブティブ品質管理因子 BAG6、及び UBQLN4 が Rab8a と相互作用する可能性を見出した。そこで、GDP 型 Rab タンパク質を認識するシャペロン候補としてプレエンブティブ品質管理機構に着目し、その構成因子である BAG6、UBQLN4、RNF126 と GTP 型、GDP 型変異体の Rab8a との相互作用を検証した。その結果、BAG6、UBQLN4、RNF126 は GDP 型変異体の Rab8a を特異的に認識することを明らかにした。また、申請者は、変異体ではなく、野生型 Rab8a の GDP 型プールに対する特異性を検証した。GDP 型から GTP 型への変換を促進する GEF タンパク質をノックダウンすることで GDP 型 Rab8a の割合を増加させ、その条件下で UBQLN4、RNF126 との相互作用を検証した。その結果、UBQLN4、RNF126 は変異型だけでなく、野生型内の GDP 型 Rab8a をも特異的に認識することを明らかにした。

- (2) プレエンブティブ品質管理因子は GDP 型 Rab タンパク質のユビキチン依存的な分解を促進する

続いて申請者は、プレエンブティブ品質管理因子が GDP 型 Rab タンパク質のユビキチン依存的な分解を制御する可能性を検証した。細胞内 BAG6、UBQLN4、RNF126 をノックダウンし、GDP 型 Rab タンパク質の分解に対する影響を検証した。その結果、プレエンブティブ品質管理因子のノックダウンは GDP 型 Rab8a の安定化を導くことを明らかにした (図 2)。

さらに申請者は、プレエンブティブ品質管理因子が GDP 型 Rab タンパク質のユビキチン化に及ぼす影響を検証した。基質認識を担う BAG6 をノックダウンし、GDP 型 Rab8a のユビキチン化量を調べた結果、BAG6 ノックダウンによって GDP 型 Rab8a のユビキチン化量が減少することを突き止めた。

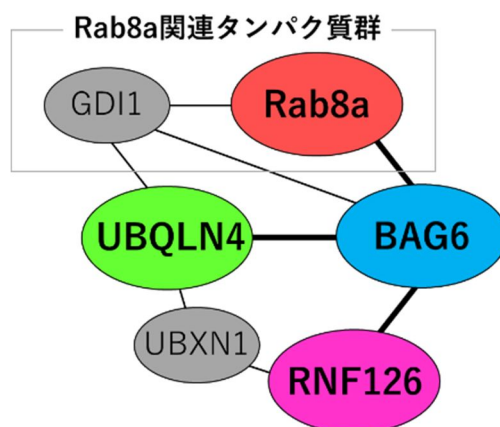


図1 インタラクトームデータベースから示唆される Rab8a 分解誘導因子の候補

また、基質のコピキチン化を阻害する薬剤 TAK243 の処理下で UBQLN4 と GDP 型 Rab8a の相互作用を検証した結果、コピキチン化されない GDP 型 Rab8a は UBQLN4 との結合量が低下することを明らかにした (図 3)。以上の結果から、GDP 型 Rab8a は BAG6 によって認識された後にコピキチン化され、その後 UBQLN4 などによってプロテアソーム分解へ導かれることを明らかにした。

(3) プレエンブティブ品質管理因子のノックダウンは一次繊毛形成を阻害する

最後に申請者は、プレエンブティブ品質管理因子による GDP 型 Rab タンパク質分解の生理的意義を検証した。Rab8a によって制御されることが知られる細胞小器官、一次繊毛に着目し、各プレエンブティブ品質管理因子のノックダウンがその形成率、長さに与える影響を検証した。その結果、BAG6、UBQLN4 ノックダウン細胞では一次繊毛の形成率が低下すること (図 4)、RNF126 ノックダウン細胞では一次繊毛の伸長が阻害されること (図 5) を見出した。

これら成果は日本生化学会本会やタンパク質分解のエキスパートが集う新学術領域「ケモテクノロジーが拓くコピキチンニューフロンティア」の研究会でも発表し、一定の評価を得ている。また、細胞生物学分野で評価の高い cell 誌系列の学術雑誌「iScience」にも採択、掲載され、他研究者からもその内容を引用されるなど高い評価を得ている。本申請研究を進展させていくことで様々なヒト疾患に関わっているといわれるメンブレントラフィックの基礎メカニズムの解明につながり、医療を含めた社会基盤の発展に寄与すると考えられる。

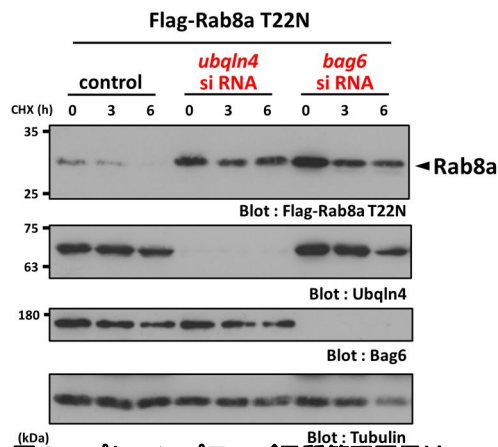


図 2 プレエンブティブ品質管理因子は GDP 型 Rab8a の分解を促進する

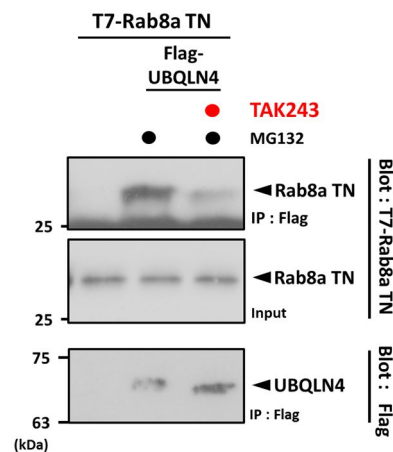


図 3 プレエンブティブ品質管理因子は GDP 型 Rab8a のコピキチン化を制御する

一次繊毛 (緑)、核 (青) 染色

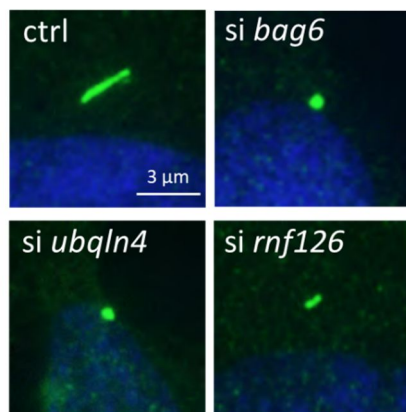


図 4

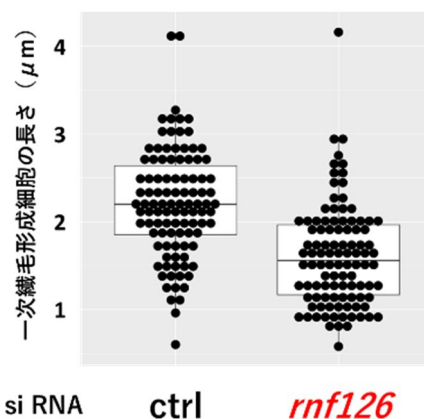


図 5

図 4、図 5 プレエンブティブ品質管理因子は一次繊毛の形成を制御する

< 引用文献 >

Takahashi, T., Shirai, J., Matsuda, M., Nakanaga, S., Matsushita, S., Wakita, K., Hayashishita, M., Suzuki, R., Noguchi, A., Yokota, N., and Kawahara, H. Protein quality control machinery supports primary ciliogenesis by eliminating GDP-bound Rab8-family GTPases. *iScience*, 26, 106652. (2023)

Takahashi, T., Minami, S., Tsuchiya, Y., Tajima, K., Sakai, N., Suga, K., Hisanaga, S., Ohbayashi, N., Fukuda, M., Kawahara, H. Cytoplasmic control of Rab family small GTPase through BAG6. *EMBO Rep.* 20, e46794. (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Takahashi Toshiki, Shirai Jun, Matsuda Miyo, Nakanaga Sae, Matsushita Shin, Wakita Kei, Hayashishita Mizuki, Suzuki Rigel, Noguchi Aya, Yokota Naoto, Kawahara Hiroyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Protein quality control machinery supports primary ciliogenesis by eliminating GDP-bound Rab8-family GTPases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106652 ~ 106652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106652	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋俊樹、松田味蓉、川原裕之
2. 発表標題 GDP型Rabタンパク質分解制御因子の同定とその生理的意義の解明
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2022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
---------	---------