

平成 27 年 4 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370077

研究課題名(和文)オートファゴソームにリクルートするRab不活性化因子群の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Rab GTPase-activating proteins that are recruited to autophagosomes

研究代表者

福田 光則(Fukuda, Mitsunori)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：50311361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、低分子量G蛋白質Rabの複数の不活性化因子がオートファゴソーム上に局在することが報告されたが、それらのオートファゴソームへのターゲティング機構やオートファジーにおける機能は明らかではなかった。本研究課題では、Rab33Bの不活性化因子OATL1に焦点を当て、LC3結合配列とオートファゴソーム膜の局在との関連性について解析を行った。その結果、OATL1がLC3との結合を介してオートファゴソームの外膜のみに局在することにより、オートファジーによる分解から回避すると共に、オートファゴソームの成熟過程に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has recently been reported that several Rab GTPase-activating proteins (GAPs) localize autophagosomes, but their precise mechanisms of autophagosomal targeting and their functions in autophagy are poorly understood. In this study, we analyzed the LC3 recognition sequence of OATL1, a Rab33B-GAP, and its localization on autophagosomes. We found that OATL1 is specifically localized outside the autophagosomal membrane through interaction with LC3 and that such asymmetric localization enables OATL1 to regulate the autophagosomal maturation without OATL1 being degraded by autophagy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Rab 解 Rab不活性化因子 膜輸送 Atg16L1 オートファジー 低分子量G蛋白質 オルガネラ 蛋白質分

1. 研究開始当初の背景

オートファジーは細胞内の蛋白質分解機構の一種で、飢餓時におけるエネルギーの産生や蛋白質凝集塊など細胞内の異物の除去に重要な役割を担っている。オートファジーの基本的な仕組みは既に良く知られており、二重膜構造を持つ隔離膜がまず伸長し、細胞質やオルガネラなどをとり囲み、オートファゴソームが形成する。その後、オートファゴソームはリソソームと融合することにより内容物が消化・分解される。このようにオートファジーは非常にダイナミックな膜輸送過程を伴うことから、膜輸送の制御因子による緻密な制御が想定されるが、オートファジーを制御する膜輸送の制御因子の実体は未だ十分に解明されていない。また近年、当研究室を含む幾つかのグループにより膜輸送の普遍的制御因子である Rab のオートファジーへの関与が報告されているが、その詳細な制御機構は明らかではなかった。最近、我々はオートファゴソーム上に OATL1 (Rab33 不活性化因子) を含む複数の Rab 不活性化因子がリクルートすることを初めて見出した。興味深いことに、オートファゴソーム上には OATL1 以外にも複数の Rab 不活性化因子 (GAPCenA, KIAA1055 など) がリクルートすることが明らかになり (*J. Cell Biol.* 2011;192:839-853)、オートファジー制御には Rab33-OATL1 を含む Rab とその不活性化因子のシグナリングネットワークが重要な役割を果たすものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々が同定したオートファゴソーム上に局在する Rab 不活性化因子群の機能解析を通して、これまで謎に包まれていた Rab によるオートファジー制御の分子基盤の解明を目的とした。具体的には、オートファゴソームにリクルートする Rab 不活性化因子群のオートファゴソームへのターゲティング機構の解明とオートファジーにおけるそれらの役割を理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) GAPCenA/TBC1D11 及び KIAA1055/TBC1D2B の各種欠失変異体を PCR 法により作成し (図 1)、pEGFP-C1 ベクターあるいは pEF-T7 ベクターにサブクローニングした。これらの変異体をマウス胚性線維芽細胞 (MEF 細胞) に発現させ、飢餓処理により誘導されるオートファゴソーム (抗 LC3 抗体陽性) との共局在を免疫染色法により検討した。

(2) 上記 (1) の解析により得られたオートファゴソームにリクルートする Rab 不活性化因子の最小領域の配列を各種アミノ酸解析ツール (モチーフ検索など) により詳細に検討した。オートファゴソーム上の LC3 と結合する LRS (LC3 recognition sequence) 配列などが見出された場合には、部位特異的アミノ酸

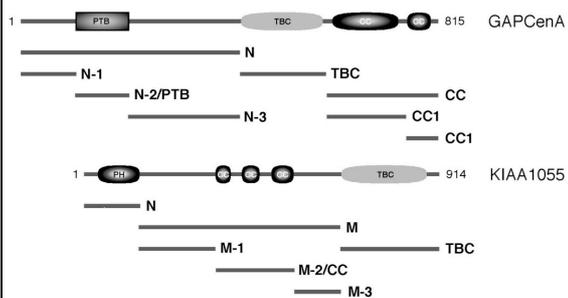


図 1 本研究で用いた Rab 不活性化因子群 (GAPCenA 及び KIAA1055) の欠失変異体

置換法により LC3 とは結合出来ず、オートファゴソームに局在出来ない変異体を作成した。

(3) Rab 不活性化因子の野生型及び変異体を安定的に発現する MEF 細胞株を樹立し、飢餓により誘導されるオートファジーへの影響を LC3-II 型の量、LC3 のドット数、p62 の分解という複数の指標から評価した。

4. 研究成果

(1) 各種欠失変異体を用いた解析により、OATL1 及び KIAA1055 に関しては LC3 を結合する LRS 配列を分子内に一つ有することが明らかになった。LC3 との結合に重要な Trp 残基を Ala に置換した OATL1(WA) 変異体や KIAA1055(WA) 変異体では、オートファゴソームに局在する能力が欠損することが明らかになった。一方、GAPCenA のオートファゴソームにリクルートする最小領域には LRS 配列は存在せず、OATL1 や KIAA1055 とは異なる機構でオートファゴソームに局在するものと考えられた。

(2) OATL1 の MEF 細胞への過剰発現により、オートファゴソームとリソソームとの融合 (すなわちオートファジーの成熟) が遅延することが明らかになった (図 2)。この効果

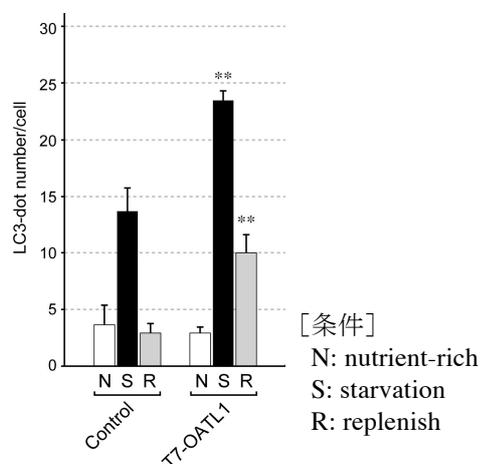


図 2 OATL1 の発現によるオートファゴソーム成熟の遅延 (S 及び R 条件での LC3 ドットの増加)

はオートファゴソームにリクルート出来ない OATL1(WA)変異体では観察されなかった。興味深いことに、OATL1 と同様な機構でオートファゴソームに局在する KIAA1055 には、オートファジー成熟遅延という効果は認められなかった。また、GAPCenA にも同様な効果は無く、これらの Rab 不活性化因子はオートファジーの成熟とは異なるステップで機能するものと推測された。

(3)OATL1 は LC3 との結合を介してオートファゴソーム上に局在するにも関わらず、オートファゴソームの基質とはならない (すなわち、分解されない) ことが明らかになった。免疫電子顕微鏡による観察から、LC3 はオートファゴソームの外膜・内膜の両側に均一に分布するが、OATL1 はオートファゴソームの外膜のみに局在することが明らかになった。

以上の結果から、OATL1 はオートファゴソームの外膜特異的に局在する (すなわち、オートファゴソーム膜上で非対称分布を取る) ことにより、自身のオートファジーによる分解から回避するだけでなく、オートファゴソームとリソソームの融合を効率よく制御するものと推察された。今後、GAPCenA や KIAA1055 に関してもオートファゴソーム膜上での詳細な局在を検討し、それらのオートファジーにおける役割を引き続き検討して行く予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 2 件)

- ① Ishida, M., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2015) Rab1A regulates anterograde melanosome transport by recruiting kinesin-1 to melanosomes through interaction with SKIP. *Sci. Rep.* 5, 8238 (査読あり)
doi: 10.1038/srep08238
- ② Yatsu, A., Shimada, H., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2015) Rab40C is a novel Varp-binding protein that promotes proteasomal degradation of Varp in melanocytes. *Biol. Open* 4, 267-275 (査読あり)
doi: 10.1242/bio.201411114
- ③ 大林典彦、福田光則：“メラノソームの微小管逆行輸送機構—白髪予防の新たな分子標的”，*フレグランスジャーナル (FRAGRANCE JOURNAL)*, 42(3), 30-35 (2014) (査読無し)
- ④ Gallo, L. I., Liao, Y., Ruiz, W. G., Clayton, D. R., Li, M., Liu, Y.-J., Jiang, Y., Fukuda, M., Apodaca, G. & Yin, X.-M. (2014) TBC1D9B functions as a GTPase-activating protein for Rab11a in polarized MDCK cells. *Mol. Biol. Cell* 25, 3779-3797 (査読あり)
doi: 10.1091/mbc.E13-10-0604
- ⑤ McGough, I. J., Steinberg, F., Gallon, M., Yatsu, A., Ohbayashi, N., Heesom, K., Fukuda, M. & Cullen, P. J. (2014) Identification of molecular heterogeneity in SNX27-retromer-mediated endosome-to-plasma membrane recycling. *J. Cell Sci.* 127, 4940-4953 (査読あり)
doi: 10.1242/jcs.156299
- ⑥ Kobayashi, H., Etoh, K., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2014) Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth. *Biol. Open* 3, 803-814 (査読あり)
doi: 1242/bio.20148771
- ⑦ Mori, Y., Fukuda, M. & Henley, J. M. (2014) Small GTPase Rab17 regulates the surface expression of kainate receptors but not α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors in hippocampal neurons via dendritic trafficking of Syntaxin-4 protein. *J. Biol. Chem.* 289, 20773-20787 (査読あり)
doi: 10.1074/jbc.M114.550632
- ⑧ Kobayashi, H., Etoh, K. & Fukuda, M. (2014) Rab35 is translocated from Arf6-positive perinuclear recycling endosomes to neurite tips during neurite outgrowth. *Small GTPases* 5, e29290 (査読あり)
doi: 10.4161/sgtp.29290
- ⑨ Ishida, M., Arai, S. P., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2014) The GTPase-deficient Rab27A(Q78L) mutant inhibits melanosome transport in melanocytes through trapping of Rab27A effector protein Slac2-a/melanophilin in their cytosol: Development of a novel melanosome-targeting tag. *J. Biol. Chem.* 289, 11059-11067 (査読あり)
doi: 10.1074/jbc.M114.552281
- ⑩ 大林典彦、福田光則：“メンブレントラフィックにおける普遍的な制御因子 Rab タンパク質”，*領域融合レビュー*, 2, e006 (2013) (査読あり)
doi: 10.7875/leading.author.2.e006
- ⑪ Fujita, N., Morita, E., Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Guan, J. L., Iwai, K., Tokunaga, F., Saito, K., Ishibashi, K., Akira, S., Fukuda, M., Noda, T. & Yoshimori, T. (2013) Recruitment of the

- autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.* 203, 115-128 (査読あり)
doi: 10.1083/jcb.201304188
- ⑫ Imai, A., Ishida, M., Fukuda, M., Nashida, T. & Shimomura, H. (2013) MADD/DENN/Rab3GEP functions as a guanine nucleotide exchange factor for Rab27 during granule exocytosis of rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 31-37 (査読あり)
doi: 10.1016/j.abb.2013.05.002
- ⑬ Mori, Y., Matsui, T., Omote, D. and Fukuda, M. (2013) Small GTPase Rab39A interacts with UACA and regulates the retinoic acid-induced neurite morphology of Neuro2A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 113-119 (査読あり)
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.051
- ⑭ Kobayashi, H. & Fukuda, M. (2013) Rab35 establishes the EHD1-association site by coordinating two distinct effectors during neurite outgrowth. *J. Cell Sci.* 126, 2424-2435 (査読あり)
doi: 10.1242/jcs.117846
- ⑮ Yatsu, A., Ohbayashi, N., Tamura, K. & Fukuda, M. (2013) Syntaxin-3 is required for melanosomal localization of Tyrp1 in melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 133, 2237-2246 (査読あり)
doi: 10.1038/jid.2013.156
- ⑯ Mori, Y. & Fukuda, M. (2013) Rabex-5 determines the neurite localization of its downstream Rab proteins in hippocampal neurons. *Commun. Integr. Biol.* 6, e25433 (査読あり)
doi: 10.4161/cib.25433
- ⑰ Fukuda, M. (2013) Rab27 effectors, pleiotropic regulators in secretory pathways. *Traffic* 14, 949-963 (査読あり)
doi: 10.1111/tra.12083
- ⑱ Nagai, H., Yasuda, S., Ohba, Y., Fukuda, M. & Nakamura, T. (2013) All members of the EPI64 subfamily of TBC/RabGAPs also have GAP activities toward Ras. *J. Biochem.* 153, 283-288 (査読あり)
doi: 10.1093/jb/mvs147
- ⑲ Onoue, K., Jofuku, A., Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Maeda, M., Koshiba, T., Itoh, T., Fukuda, M., Otera, H., Oka, T., Takano, H., Mizushima, N., Mihara, K. & Ishihara, N. (2013) Fis1 acts as a mitochondrial recruitment factor for TBC1D15 that is involved in regulation of mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* 126, 176-185 (査読あり)
doi: 10.1242/jcs.111211
- ⑳ Klionsky D. J., ... Fukuda, M., *et al.* (1271人中 330 番目) (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544 (査読無し)
doi: 10.4161/auto.19496
- ㉑ Yasuda, T., Saegusa, C., Kamakura, S., Sumimoto, H. & Fukuda, M. (2012) Rab27 effector Slp2-a transports the apical signaling molecule podocalyxin to the apical surface of MDCK II cells and regulates claudin-2 expression. *Mol. Biol. Cell* 23, 3229-3239 (査読あり)
doi: 10.1091/mbc.E12-02-0104
- ㉒ Ishibashi, K., Uemura, T., Waguri, S. & Fukuda, M. (2012) Atg16L1, an essential factor for canonical autophagy, participates in hormone secretion from PC12 cells independently of autophagic activity. *Mol. Biol. Cell* 23, 3193-3202 (査読あり)
doi: 10.1091/mbc.E12-01-0010
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 福田光則
分泌顆粒の制御に関わる Rab ファミリーの網羅的機能解析
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会シンポジウム「エキソサイトーシス・エンドサイトーシス研究の最前線」(神戸) 2015 年 3 月 21 日
- ② 福田光則
低分子量 G 蛋白質 Rab が制御する多彩な生命現象～メラニン輸送、神経回路網形成、オートファジーから感染症まで～
国立感染症研究所・学友会・文化祭シンポジウム (東京) 2014 年 11 月 28 日
- ③ 福田光則
Rab ファミリーによるメラニン合成酵素の輸送制御とその破綻による白皮症
第 86 回日本生化学会大会シンポジウム「メンブレントラフィック：基礎と疾患の理解へ向けて」(京都) 2014 年 10 月 18 日
- ④ Mitsunori Fukuda
The molecular mechanism of melanosome transport in melanocytes.
The SFB629 symposium “Molecular Cell Dynamics” (Münster, Germany) June 13, 2014
- ⑤ 福田光則
腎臓尿細管上皮細胞における Rab27 依存的

及び非依存的 Slp2-a の機能
第 66 回日本細胞生物学会大会シンポジウム「細胞の恒常性維持の破綻そして疾患」
(奈良) 2014 年 6 月 12 日

⑥ 福田光則

メラノソームのロジスティクスを司る低分子量 G 蛋白質 Rab の機能解析
新学術領域研究「細胞内ロジスティクス」・シンポジウム (淡路島) 2013 年 9 月 17 日

⑦ 福田光則

リサイクリングエンドソーム Rab による神経突起伸長・分化の制御メカニズム
第 86 回日本生化学会大会シンポジウム「細胞が持つリサイクルシステム研究の新展開」(横浜) 2013 年 9 月 12 日

⑧ 伊藤敬、藤田尚信、齊藤達哉、小松雅明、
審良静男、吉森保、福田光則
Atg12-5/16L1 複合体による Rab33B 依存的膜輸送制御の可能性について
第 35 回日本分子生物学会年会 (福岡) 2012 年 12 月 13 日

⑨ 福田光則

低分子量 GTPase Rab が司る多彩な生命現象 ~メラニン輸送、神経細胞の極性輸送からオートファジーまで~
理化学研究所・細胞システムコロキウム (埼玉) 2012 年 12 月 7 日

[その他]

東北大学・生命科学研究所・膜輸送機構解析分野・ホームページ
http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/teacher/t_fukuda/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 光則 (FUKUDA MITSUNORI)
東北大学・生命科学研究所・教授
研究者番号: 50311361

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし