

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570206

研究課題名(和文)色素細胞活性化における Varp の機能解析

研究課題名(英文) Effects of Varp on the activation of melanocytes

研究代表者

大林 典彦 (Ohbayashi, Norihiko)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：40421979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000 円

研究成果の概要(和文)：メラニンとは、有害な紫外線から細胞を守るために必要だが、一方でしみやそばかすの原因ともなり、皮膚に沈着する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。メラニンは色素細胞のメラノソームと呼ばれるオルガネラ(脂質でできた袋)で合成・貯蔵され、このメラノソームが隣接する皮膚の細胞や毛母細胞に受け渡されることで、皮膚や髪が黒くなる。本研究では、Varpと呼ばれる分子が低分子量Gタンパク質の1つであるRab21を活性化し、色素細胞の突起形成を促すことで、メラノソームが受け渡しやすくなることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Melanin helps protect human beings from harmful ultra-violet exposure, but the excess production of melanin causes skin stains and freckles, therefore regulating the amount of melanin in skin is essential for maintaining quality of life. Melanocytes are known as melanin-producing cells and activated upon UV stimulation to transfer melanosomes that contain melanin toward the neighboring keratinocytes and hair matrix cells. This research demonstrated that one of the guanine nucleotide exchange factors, named Varp, activates Rab21 to elongate melanocytic dendrites, which facilitates the transfer of melanin from melanocytes to neighboring keratinocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：色素細胞 メラニン 突起形成 低分子量Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

メラニン、有害な紫外線から細胞を守るために必要であるが、その一方で、しみやそばかすの原因ともなり、ケラチノサイトに沈着するメラニンの量を適切に制御することは生活の品質向上にとって不可欠と考えられる。メラニンを実際に作り出すのはケラチノサイトではなく、表皮基底部に存在している色素細胞であり、メラニンがケラチノサイトへと受け渡されるには様々なステップがある。

(1) メラニン合成

色素細胞にはメラノソームと呼ばれる特殊なオルガネラが存在しており、そのなかでメラニンは合成されている。まず未成熟なメラノソームに、トランスゴルジ網から分泌されたメラニン合成酵素(チロシナーゼや Tyrp1 など)が輸送されることで、メラニン合成が開始する。

(2) メラノソームの輸送

成熟したメラノソームは、微小管やアクチン線維といった細胞内骨格に沿って輸送される。その際、微小管輸送ではキネシンモーターやダイニンモーターが制御している。一方、アクチン線維上ではミオシンモーターによる制御が重要である。これらのモーターの働きにより、メラノソームは細胞膜へと運ばれる。

(3) 色素細胞のデンドライト伸長

つぎに色素細胞は、周囲に存在しているケラチノサイトに効率的にメラノソームを受け渡すため、デンドライトを伸長させる。

(4) メラニンの転移

引き続き、メラノソームは色素細胞からケラチノサイトへと受け渡されることで、ケラチノサイトの暗色化が亢進する。

これら(1)～(4)のステップが滞りなく行われることで、皮膚の暗色化が亢進する。例えば(2)メラニンの輸送において、Rab27Aをはじめ、メラノソームのアクチン線維上での輸送を制御する Slac2-a、MyosinVa などに機能異常が生じると、メラノソームが正しく色素細胞内を輸送されず、白皮症の原因となることが知られている。

これまでの我々を中心とした研究により、これらのステップのなかでも(1)メラニン合成・(2)メラノソームの輸送過程については、その制御機構がよく分かってきている。つぎに残された(3)(4)のステップの解明が、皮膚暗色化の理解のために必要であるが、これらステップの制御機構についてはその詳細が明らかではなかった。

これまで若手研究B「新規 Rab32/38 結合分子によるメラノソーム形成・成熟機構の解明(H22~H23年)」のサポートを受け、Rab32/38 特異的結合分子として Varp (VPS9-ankyrin-repeat protein) と呼ばれる分子を世界に先駆けて同定することに成功していた (Mol Biol Cell (2009) 20,

2900-2908; J Biol Chem (2011) 286, 7507-7521)。Varp は、エンドソームの輸送を制御する Rab21 の活性化を行う VPS9 ドメイン (GEF ドメイン) とアンキリンリピート (ANKR) をタンデムに有しており、ANKR については、活性化型 Rab32/38 と結合することで(1)メラニン合成に關与することを明らかにしていた。

また、色素細胞は α -MSH などの刺激により活性化され、cAMP 依存的にデンドライトを伸長することが知られている。デンドライト形成は Forskolin (FSK) (或いは IBMX) 処理により代用できるが、興味深いことに FSK で誘導される色素細胞のデンドライト伸長が Varp あるいは Rab21 ノックダウンにより顕著に抑制されることを予備的に見出しており、(3)色素細胞のデンドライト伸長の制御機構解明にむけての手がかりをつかんでいた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、Rab21・Varp 経路が制御する色素細胞のデンドライト伸長メカニズムを明らかにすることで、皮膚暗色化に対する理解を深めることを目的とした。また、Varp の ANKR と VPS9 ドメインは、それぞれ「活性化型 Rab32/38 の結合」と「Rab21 の活性化」を担う 2 つのドメインを有しているが、Rab32/38 と Rab21 を Varp はどのようにして使い分けているのか、といった点についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) デンドライト伸長における Varp、Rab21 のヒエラルキー解析

Varp は Rab21-GEF として作用することから、色素細胞のデンドライト伸長にとって、Varp による Rab21 の活性化が重要である可能性が高い。これを証明するために、Varp ノックダウン色素細胞に対して恒常的活性化型 Rab21 を発現させるなど、細胞生物学的アプローチによりデンドライト伸長における Varp、Rab21 のヒエラルキーを検証した。

(2) FSK 処理による Varp や Rab21 の活性化状態の解析

FSK (或いは IBMX) 処理した色素細胞中では cAMP 産生が亢進し、PKA (cAMP-dependent protein kinase) が活性化することで知られている。また神経細胞では、MAPK (ERK1/2) をはじめ様々なキナーゼを活性化されることが神経突起伸長に必要であることから、どのようなシグナル経路が Varp・Rab21 による色素細胞デンドライト伸長に必要なのかを各種キナーゼ阻害剤により検討を行った。また FSK 処理後、刺激依存的な Varp や Rab21 の活性化状態の変化なども検証を行った。

(3) Varp によって異なる Rab アイソフォームを使い分ける仕組みを検討

これまでの先行研究から、Rab32/38 陽性小胞はメラニン合成酵素輸送に關与すること、また Rab21 陽性小胞はデンドライト伸長に關

与することが分かりつつあったことから、双方の小胞の差異を明らかにするため、オルガネラ免疫沈降法を用いた生化学的手法により検証を行った。

(4) Varp のさらなるドメインの機能解析

Varp には VPS9 ドメイン (Rab21 を活性化)、ANKR ドメイン (活性化型 Rab32/38 が結合) の他にも、SNARE 分子の 1 つである VAMP7 が結合する VID (VAMP7-interaction domain) が存在することが新たに分かり、VID の機能を検証した。

4. 研究成果

(1) デンドライト伸長における Varp、Rab21 のヒエラルキー解析

Rab21 と Varp のヒエラルキーを明らかにするために、活性化型 Rab21 を Varp ノックダウン色素細胞に発現させたところ、デンドライトの伸長がレスキューされることを見出した。さらに、Varp の Rab21 活性化ドメインである VPS9 ドメインの活性中心に点変異を導入した変異体 Varp を構築し、これを Varp ノックダウン色素細胞に発現させたところ、デンドライト伸長をレスキューすることができなかった。これらの結果から、Varp による Rab21 の活性化が色素細胞のデンドライト伸長に必須であることが分かった (図 1)。

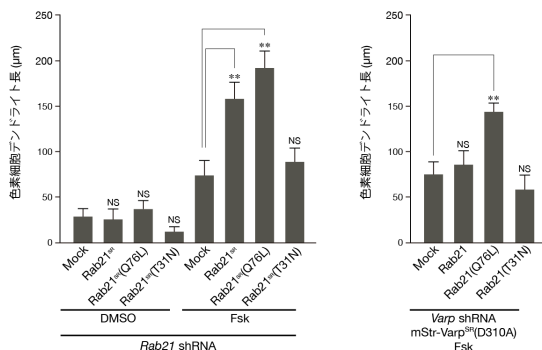


図 1 Rab21 はデンドライト伸長に必須

(2) FSK 処理による Varp や Rab21 の活性化状態の解析

色素細胞に対する FSK 処理によるデンドライト伸長には、PKA の活性化が関与することが PKA 阻害剤 H-89 を用いた解析により明らかになった。また、ERK や Akt などの神経突起伸長の制御に必須なキナーゼについては、阻害剤の実験から色素細胞のデンドライト伸長に関与しないことが明らかになった。

また、APPL1 の活性化型 Rab21 結合領域を用いたプルダウン実験により、色素細胞の FSK 刺激により Rab21 が活性化されることが明らかになった (図 2)。しかし Varp については、色素細胞の FSK 処理後にどのような翻訳後修飾がなされるのかについては未だ不明である。今後の検討課題としたい。

(3) Varp によって異なる Rab アイソフォームを使い分ける仕組みを検討

Rab21 を欠損した色素細胞では、FSK 刺激

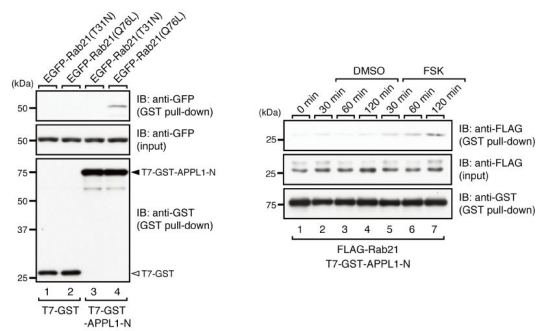


図 2 Rab21 は FSK 処理により活性化

によりデンドライト伸長が抑制されるのに対し、Rab32/38 の機能を欠損した色素細胞では、デンドライト伸長に全く異常が認められなかった。一方、Rab32/38 を欠損した色素細胞ではメラニン合成酵素が消失したが、Rab21 を欠損した色素細胞では、メラニン合成酵素の消失は認められなかった。

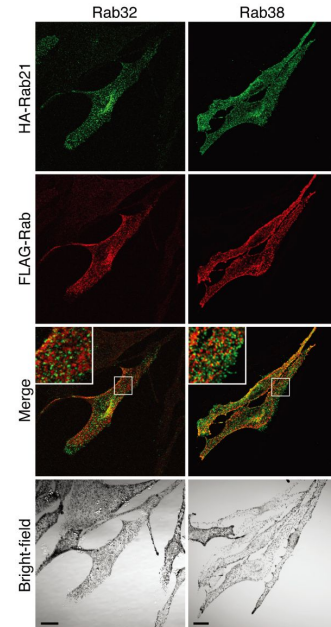


図 3 Rab32/38 と Rab21 の局在性の検討

そこで、Rab21 と Rab32/38 の色素細胞内での局在を検討したところ、それぞれが異なる小胞上に存在することが明らかになった (図 3)。さらに、色素細胞のホモネートから Rab32/38 陽性膜画分あるいは Rab21 陽性膜画分をオルガネラ免疫沈降法により単離したところ、Rab32/38 陽性画分からはチロシナーゼ (Tyr) や Tyrp1 などのメラニン合成酵素が、また Rab21 陽性画分からは EEA1 などのエンドソームに局在するタンパク質が検出された。さらに、Varp は Rab32/38 陽性画分、Rab21 陽性画分双方から検出された。

(4) Varp のさらなるドメインの機能解析

Varp は VAMP7 と結合することがわかり、双方の色素細胞における局在を検討したところ、VAMP7 は Varp と共に Rab32/38 陽性小胞ならびに Rab21 陽性小胞の双方に局在することが、細胞生物学的・ならびにオルガネラ免疫沈降による生化学的検証により明らかになった。さらに興味深いことに、VAMP7 を欠損した色素細胞では、Varp 欠損色素細胞と同様、Tyr・Tyrp1 といったメラニン合成酵素の輸送障害、ならびに樹状突起伸長の抑制が観

察された。以上の結果をまとめると、下記の図4となる。

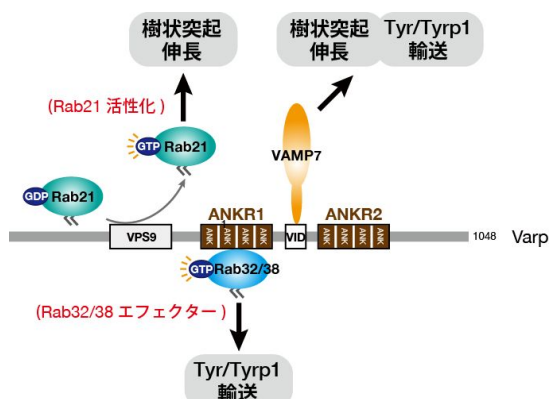


図4 Varpとそのパートナー分子によるメラニン合成酵素輸送と dendrocyte 伸長

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 15件)

Kobayashi, H., Etoh, K., Ohbayashi, N., and Fukuda, M., Rab35 promotes the recruitment of Rab8, Rab13 and Rab36 to recycling endosomes through MICAL-L1 during neurite outgrowth, *Biol Open*, 査読有、2014年、3巻、803 - 814、DOI: 10.1242/bio.20148771.

Nishiyama, H., Koizumi, M., Ogawa, K., Kitamura, S., Konyuba, Y., Watanabe, Y., Ohbayashi, N., Fukuda, M., Suga, M., and Sato, C., Atmospheric scanning electron microscope system with an open sample chamber: configuration and applications, *Ultramicroscopy*, 査読有、2014年、147巻、86 - 97、DOI: 10.1016/j.ultramicro.2014.06.001.

Azouz, N.P., Zur, N., Efergan, A., Ohbayashi, N., Fukuda, M., Amihai, D., Hammel, I., Rothenberg, M.E., and Sagi-Eisenberg, R., Rab5 is a novel regulator of mast cell secretory granules: impact on size, cargo, and exocytosis, *J. Immunol.*, 査読有、2014年、192巻、4043 - 4053、DOI: 10.4049/jimmunol.1302196.

Ishida, M., Arai, S.P., Ohbayashi, N., and Fukuda, M., 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.*, 査読有、2014年、289巻、11059 - 11067、

DOI: 10.1074/jbc.M114.552281.

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*、査読無、2014年、42巻、30 - 35.

Yatsu, A., Ohbayashi, N., Tamura, K., and Fukuda, M., Syntaxin-3 is required for melanosomal localization of Tyrp1 in melanocytes, *J. Invest. Dermatol.*, 査読有、2013年、133巻、2237 - 2246、DOI: 10.1038/jid.2013.156.

Ljubicic, S., Bezzi, P., Brajkovic, S., Nesca, V., Guay, C., Ohbayashi, N., Fukuda, M., Abderrhamani, A., and Regazzi, R., The GTPase Rab37 Participates in the Control of Insulin Exocytosis, *PLoS One*, 査読有、2013年、8巻、e68255、DOI: 10.1371/journal.pone.0068255.

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、査読有、2013年、2巻、e006、DOI: 10.7875/leading.author.2.e006.

石田森衛、大林典彦、谷津彩香、福田光則、メラノソームの形成・成熟・輸送の仕組み、顕微鏡、査読無、2013年、48巻、26 - 32.

Ohbayashi, N., Maruta, Y., Ishida, M., and Fukuda, M., Melanoregulin regulates retrograde melanosome transport through interaction with the RILP-p150^{Glued} complex in melanocytes, *J. Cell Sci.*, 査読有、2012年、125巻、1508 - 1518、DOI: 10.1242/jcs.094185.

Ohbayashi, N., Yatsu, A., Tamura, K., and Fukuda, M., The Rab21-GEF activity of Varp, but not its Rab32/38 effector function, is required for dendrite formation in melanocytes, *Mol. Biol. Cell*, 査読有、2012年、23巻、669 - 678、DOI: 10.1091/mbc.E11-04-0324.

Matsui, T., Ohbayashi, N., and Fukuda, M., The Rab interacting lysosomal protein (RILP) homology domain functions as a novel effector domain for small GTPase Rab36: Rab36 regulates retrograde melanosome transport in melanocytes, *J. Biol. Chem.*, 査読有、2012年、287巻、28619 - 28631、DOI: 10.1074/jbc.M112.370544.

Ishida, M., Ohbayashi, N., Maruta, Y.,

Ebata, Y., and Fukuda, M., Functional involvement of Rab1A in microtubule-dependent anterograde melanosome transport in melanocytes, *J. Cell Sci.*, 査読有、125 巻、2012 年、287 巻、5177 - 5187、DOI: 10.1242/jcs.109314.

Ohbayashi, N., and Fukuda, M., Role of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics, *J. Biochem.*, 査読有、2012 年、151 巻、343 - 351、DOI: 10.1093/jb/mvs009.

石田森衛、大林典彦、福田光則、メラニン色素の輸送システムを制御する新たなタンパク質の発見、*フレグランスジャーナル*、査読無、2012 年、40 巻、16 - 21.

〔学会発表〕(計 7 件)

島田光、谷津彩香、大林典彦、福田光則、Varp の新規結合タンパク質・Rab40C はメラノサイトにおいて Varp のプロテアソーム依存的な分解を促進する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、京都国際会議場(京都)

荒井沙希、石田森衛、大林典彦、福田光則、常時活性化型 Rab27A 変異体はエフェクター分子である Slac2-a を細胞質でトラップすることによってメラノソーム輸送を阻害する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、京都国際会議場(京都)

荒井沙希、石田森衛、大林典彦、福田光則、常時活性化型 Rab27A 変異体によるメラノソーム輸送阻害の原因を探る～メラノレギュリン分子を利用した新たなメラノソーム局在化ツールの開発～、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際会議場(神戸)

谷津彩香、大林典彦、田村可南子、福田光則、Syntaxin-3 はメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を制御する、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜(横浜)

大林典彦、メラノソームの微小管輸送における Rab small GTPase の役割、第 85 回日本生化学会大会(招待講演)、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

谷津彩香、大林典彦、田村可南子、福田光則、メラノサイトの樹状突起伸長における Varp の役割、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

石田森衛、大林典彦、丸田優人、江幡由佳、福田 光則、Rab1A はメラノソームの微小管順行性輸送を制御する、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
大林 典彦 (OHBAYASHI, NORIHIKO)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：40421979

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：