

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07039

研究課題名(和文) Rabによるエフェクター分子分解機構の解明

研究課題名(英文) Degradation mechanism of effector molecules by Rab small GTPase

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Varp-ANKR2結合タンパク質としてRab40Cを同定し、メラノサイトにおけるTypr1の輸送に対するRab40Cの関与を解析した。メラノサイトにRab40Cを過剰発現したところ、そのSOCSボックス依存的にVarpがプロテアソーム依存的に分解を受け、Typr1シグナルを劇的に減少させた。さらに、メラノサイトにおけるRab40CのノックダウンがVarpの量を増加させることを示し、興味深いことに、Rab40CのノックダウンはTypr1シグナルの減少も引き起こすことを見出した。これらの結果、Rab40CがVarpの分解を制御しTypr1輸送を制御する新規調節因子であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Varp has been shown to function as a Rab32/Rab38 effector through its first ANKR1 domain. Although these functions of Varp are important for melanogenesis, Varp contains a second ANKR2 domain, whose function remained completely unknown. Here Rab40C was identified as a novel ANKR2-binding protein and it was investigated that Rab40C-involvement in melanogenic enzyme trafficking in melanocytes. The results here showed that overexpression of Rab40C in melanocytes caused a dramatic reduction in melanogenic enzyme Typr1 signals by promoting proteasomal degradation of Varp in a SOCS-box-dependent manner and that knockdown of Rab40C in melanocytes caused an increase in the amount of Varp. Intriguingly, Rab40C knockdown also caused a dramatic reduction in Typr1 signals, the same as Varp overexpression did. These findings indicated that Rab40C is a previously unexpected regulator of Typr1 trafficking in melanocytes through controlling the proteasomal degradation of Varp.

研究分野：細胞生物学

キーワード：色素細胞 Rab プロテアソーム メラニン合成酵素 低分子量Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

紫外線からの細胞防御に重要な役割を果たしているメラニン、色素細胞においてメラノソームと呼ばれる細胞内の特殊な膜小胞において合成・貯蔵されている。メラニン合成には、チロシナーゼ (Tyr) や Tyrp1 といったメラニン合成酵素の働きが必須であり、これらの酵素はトランスゴルジ網から分泌された後、未成熟なメラノソームに輸送されることで、メラニン合成が開始する。メラニン合成酵素のメラノソームへの輸送には、小胞輸送に関わる Rab32、Rab38 が冗長的に機能し (以下 Rab32/Rab38 とする)、Rab32/Rab38 のエフェクター分子 Varp (VPS9-ankyrin-repeat protein) と複合体を形成することが必須である。Varp は ANKR (アンキリンリピート) をはじめとする様々なドメインを有し、ANKR1 ドメインを介して Rab32/Rab38 と複合体を形成する。さらに、Varp には ANKR1 と比較的相同性の高い ANKR2 ドメインが存在するが、研究開始当初、その機能は不明であった。

2. 研究の目的

これまで、Rab32/Rab38-Varp からなる複合体に関する研究を行い、この複合体がメラニン合成酵素の輸送を促進することを見出してきた。本研究では、Varp に存在する機能未知のドメイン ANKR2 に着目し、ANKR2 を介して結合する新しいパートナー Rab40C による Varp の分解機構を明らかにすることを目指している。一般的に、Rab は膜輸送を制御する因子として考えられているが、本研究の目標は、Rab によるエフェクター分子の分解促進という独創的且つ新規の研究概念の創出にあった。

3. 研究の方法

(1) Rab40C 過剰発現による Varp の発現量減少に対する生化学的検証

Rab40C の色素細胞への過剰発現により Varp の発現量が減少することを細胞レベルで定性的に見出し、この表現型をより確かなものにするためには生化学的な定量解析を行う必要があった。そこで、Rab40C を過剰発現した色素細胞のライセートを用いたウェスタンブロットを行うことで、色素細胞に内在する Varp のタンパク質発現量の定量化を試みた。

(2) Rab40C による Varp の発現量減少機構に対する検証

Rab40C の SOCS ボックスは、Cullin-5 E3 ユビキチンリガーゼが結合するモチーフとして知られている。この SOCS ボックスの生理機能を明らかにするために、SOCS ボックスを欠いた Rab40C- SOCS 変異体を構築し、Varp の発現レベルへの影響を検討した。色素細胞に Rab40C- SOCS 変異体を発現させた際に、野生型 Rab40C を発現させた際にみられる

Varp の発現量減少が引き起こされるかどうかを細胞生物学的・生化学的アプローチにより検証した。

(3) Rab40C と Varp の細胞内局在に対する検証

Varp と Rab40C の細胞内局在を明らかにすることは、それらの生理機能を理解する上で極めて重要である。そこで、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理した色素細胞において、Varp と Rab40C の細胞内局在を検討した。

(4) Rab40C ノックダウンによる Varp の発現量についての検証

Rab40C による Varp 発現量の調節機構を理解するためには、Rab40C の過剰発現による効果だけでなく、内在性の Rab40C の機能を検証する必要があった。そこで、siRNA を用いて色素細胞に内在する Rab40C をノックダウンすることより、Varp の発現量に対する影響を細胞生物学的・生化学的に検証した。

4. 研究成果

(1) 新規な VARP 結合タンパク質としての Rab40C の同定

Varp と Rab40C との間の相互作用が哺乳動物細胞で起こるかどうかを決定するために、共免疫沈降アッセイを行ったところ、Varp と Rab40C が結合することを見出した。さらに、Varp は不活性変異体 Rab40C-G28N よりも活性変異体 Rab40C-Q73L と強く結合したことから、Varp が Rab40C の GTP 結合活性型を優先的に認識することを明らかにした。Rab40 サブファミリーのメンバーは、ユビキチンリガーゼ複合体に関連する SOCS ボックスを含むことがユニークである。Rab40C-SOCS ボックスの Varp 結合への関与を調べるために、SOCS ボックス欠失突然変異体 (Rab40C- SOCS) を作製し、共免疫沈降アッセイによりその Varp 結合能力を評価した。しかし、Rab40C-SOCS 変異体は、野生型 Rab40C と同じく Varp と相互作用した。まとめると、これらの結果は、Varp の ANKR2 ドメインがその SOCS ボックスではなく Rab40C の GTP アーゼドメインと相互作用することを示している。

(2) メラノサイトにおける Varp 発現のレベルに対する Rab40C の過剰発現の影響

細胞レベルでの Varp と Rab40C との間の共同部位を同定するために、mStr-Varp および EGFP-Rab40C をメラノサイトで共発現させた。しかし、驚くべきことに、EGFP-Rab40C 発現レベルが比較的高い場合には、十分な量の mStr-Varp シグナルを検出することができなかった。対照的に、mStr-Varp シグナルは、EGFP のみがメラノサイトで過剰発現したときに容易に検出された。Varp 発現を抑制する同様の傾向も、Varp に優先的に結合する活性型変異体 Rab40C 変異体 Rab40C-Q73L に応答

して観察された。一方、Varp にほとんど結合しない不活性型変異体である Rab40C-G28N は、Varp 発現に影響を及ぼさなかった。興味深いことに、Varp 結合能を保持した Rab40C- SOCS 変異体を発現したメラノサイトでは、コントロールである EGFP 単独と同様に Varp の発現を観察することができた。

上記のように、Rab40 の SOCS ボックスは、ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットである Cullin5 と相互作用することが示されている。したがって、Rab40C が SOCS ボックス依存的に Varp のユビキチン化および分解を促進する可能性が高いと考えられた。予想されたように、Varp 自体のユビキチン化修飾がメラノサイトにおいてされた。プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理すると、Rab40C 発現メラノサイトにおける Varp の量が対照レベルに回復したので、ユビキチン化 Varp はプロテアソームによって分解されると考えられた。さらに、mStr-Varp とユビキチンとの共局在は、MG132 処理メラノサイトでしばしば観察された。これらの結果をまとめると、Rab40C は、SOCS ボックス依存的様式で ANKR2 ドメインとの相互作用を介して Varp のユビキチン化および分解を促進することが示された。

(3) メラノサイトにおける Tyrp1 輸送に対する Rab40C の過剰発現の影響

上記の Rab40C 過剰発現細胞における Varp の発現低下という実験結果をうけ、Rab40C が Varp-Rab32/Rab38 複合体のカーゴの1つである Tyrp1 の輸送にも影響するかどうかを検討した。Rab40C-WT および Rab40C-Q73L の両方が Tyrp1 の量を有意に減少させたが、Rab40C-G28N または Rab40C- SOCS は Tyrp1 シグナルにほとんど影響を与えなかった。これは、Rab40C-G28N も Rab40C- SOCS も Varp 発現レベルに影響しないという事実と一致する。従って、メラノサイトにおける Rab40C 過剰発現依存的な Varp タンパク質量の低下は、Varp ノックダウンと同じくメラノソームへの Tyrp1 輸送を阻害するために十分であると結論付けた。

(4) Rab40C ノックダウンが Varp 発現レベルおよび Tyrp1 輸送に及ぼす影響

Rab40C が Varp 発現レベルを制御する重要な因子であるならば、メラノサイトにおける Rab40C ノックダウンも Varp 発現に影響を及ぼさずである。それを調べるために、Rab40C に対する特異的 siRNA を用いてメラノサイトの内因性 Rab40C をノックダウンした。Rab40C のノックダウンは、メラノサイト内の内在性 Varp mRNA の発現に影響しなかったが、Varp タンパク質が明らかに増加した。しかし、驚くべきことに、Rab40C 過剰発現細胞と同じく、Rab40C ノックダウン細胞における Tyrp1 シグナルの劇的な減少が観察された。Rab40C

ノックダウン細胞における Varp タンパク質の増加が Tyrp1 シグナルの減少の主な原因であるかどうかを決定するために、Varp 過剰発現の Tyrp1 シグナルに対する効果を検証した。予想通り、メラノサイトにおける完全長 Varp の発現は、Tyrp1 シグナルを劇的に減少させた。これらの結果は、Rab40C ノックダウン細胞における Tyrp1 シグナルの減少が主に Varp 分子の増加に起因することを示している。

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14件)

Tsai MT, Katagiri N, Ohbayashi N, Iwasaki K, Ohkohchi N, Ding ST, Kanaho Y, Funakoshi Y (2017) Regulation of HGF-induced hepatocyte proliferation by the small GTPase Arf6 through the PIP2-producing enzyme PIP5K1A. *Sci Rep* 7: 9438.

doi:10.1038/s41598-017-09633-z.

Takahama M, Fukuda M, Ohbayashi N, Kozaki T, Misawa T, Okamoto T, Matsuura Y, Akira S, Saitoh T (2017) The RAB2B-GARIL5 Complex Promotes Cytosolic DNA-Induced Innate Immune Responses. *Cell Rep* 20: 2944-2954. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.085.

Ohbayashi N, Fukuda M, Kanaho Y (2017) Rab32 subfamily small GTPases: pleiotropic Rabs in endosomal trafficking. *J Biochem* 162: 65-71. doi: 10.1093/jb/mvx027.

Miura Y, Ngo Thai Bich V, Furuya M, Hasegawa H, Takahashi S, Katagiri N, Hongu T, Funakoshi Y, Ohbayashi N, Kanaho Y (2017) The small G protein Arf6 expressed in keratinocytes by HGF stimulation is a regulator for skin wound healing. *Sci Rep* 7: 46649. doi: 10.1038/srep46649.

Lin YC, Ohbayashi N, Hongu T, Katagiri N, Funakoshi Y, Lee H, Kanaho Y (2017)

Arf6 in lymphatic endothelial cells regulates lymphangiogenesis by controlling directional cell migration. *Sci Rep* 7: 11431. doi: 10.1038/s41598-017-11240-x.

Aoki Y, Manzano R, Lee Y, Dafinca R, Aoki M, Douglas AGL, Varela MA, Sathyaprakash C, Scaber J, Barbagallo P, Vader P, Mager I, Ezzat K, Turner MR, Ito N, Gasco S, Ohbayashi N, El Andaloussi S, Takeda S, Fukuda M et al. (2017) C9orf72 and RAB7L1 regulate vesicle trafficking in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Brain* 140: 887-897. doi: 10.1093/brain/awx024.

Miura Y, Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y (2016) ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons. *Biochem J* 473: 2591-602. doi: 10.1042/BCJ20160183.

Marubashi S, Shimada H, Fukuda M, Ohbayashi N (2016) RUTBC1 Functions as a GTPase-activating Protein for Rab32/38 and Regulates Melanogenic Enzyme Trafficking in Melanocytes. *J Biol Chem* 291: 1427-40. doi: 10.1074/jbc.M115.684043.

Marubashi S, Ohbayashi N, Fukuda M (2016) A Varp-Binding Protein, RACK1, Regulates Dendrite Outgrowth through Stabilization of Varp Protein in Mouse Melanocytes. *J Invest Dermatol* 136: 1672-80. doi: 10.1016/j.jid.2016.03.034.

Hongu T, Yamauchi Y, Funakoshi Y, Katagiri N, Ohbayashi N, Kanaho Y

(2016) Pathological functions of the small GTPase Arf6 in cancer progression: Tumor angiogenesis and metastasis. *Small GTPases* 7: 47-53. doi: 10.1080/21541248.2016.1154640.

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: 267-75. doi: 10.1242/bio.201411114.

Okada R, Yamauchi Y, Hongu T, Funakoshi Y, Ohbayashi N, Hasegawa H, Kanaho Y (2015) Activation of the Small G Protein Arf6 by Dynamin2 through Guanine Nucleotide Exchange Factors in Endocytosis. *Sci Rep* 5: 14919. doi: 10.1038/srep14919.

Kobayashi H, Etoh K, Marubashi S, Ohbayashi N, Fukuda M (2015) Measurement of Rab35 activity with the GTP-Rab35 trapper RBD35. *Methods Mol Biol* 1298: 207-16. doi: 10.1007/978-1-4939-2569-8_18.

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. doi: 10.1038/srep08238.

[学会発表](計15件)

Soujiro Marubashi, Norihiko Ohbayashi and Mitsunori Fukuda (2017) A Varp-binding protein, RACK1, regulates dendrite outgrowth through stabilization of Varp protein in melanocytes. The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease, Sendai

山内庸平、本宮綱記、山口英樹、船越祐司、大林典彦、金保安則 (2016) 癌細胞浸潤における Arf6 GTPase 活性化因子 ARAP3 の機能解析 第 89 回日本生化学会、仙台

宮地泰人、本宮綱記、船越祐司、大林典彦、金保安則 (2016) 低分子量 G 蛋白質 Arf6 を介したラッフル膜形成メカニズムの解析 第 89 回日本生化学会、仙台

山内庸平、本宮綱記、山口英樹、船越祐司、大林典彦、金保安則 (2016) 癌細胞浸潤における Arf6 GTPase 活性化因子 ARAP3 の機能解析 第 68 回日本細胞生物学会大会、京都

三浦悠樹、本宮綱記、片桐尚宏、船越祐司、大林典彦、金保安則 (2016) ACAP3 regulates neurite outgrowth through its GAP activity specific to Arf6 in mouse hippocampal neurons 第 68 回日本細胞生物学会大会、京都

Lin Yueh-Chien, Norihiko Ohbayashi, Tsunaki Hongu, Yuji Funakoshi, Lee Hsinyu, Yasunori Kanaho. (2016) The function of the small GTPases Arf6 in lymphangiogenesis. Tsukuba Global Science Week 2016, Tsukuba

Yohei Yamauchi, Tsunaki Hongu, Hideki Yamaguchi, Yuji Funakoshi, Norihiko Ohbayashi, Yasunori Kanaho. (2016) Inactivation of the small GTPase Arf6 by the Arf6 GAP ARAP3 is critical for breast cancer cell invasion and metastasis. FASEB 2016 Science Research Conferences, Steamboat Springs, CO

Yohei Yamauchi, Tsunaki Hongu, Hideki Yamaguchi, Yuji Funakoshi, Norihiko Ohbayashi, Yasunori Kanaho. (2016) The 9th KOREA-JAPAN Conference on

Cellular Signaling for Young Scientists, Seoul, Korea.

丸橋総史郎、大林典彦、福田光則 (2015) Varp の新規結合分子の探索とメラノサイトのデンドライト形成への関与 日本生化学会東北支部第 81 回例会、仙台
三浦悠樹、本宮綱記、船越祐司、大林典彦、金保安則 (2015) ACAP3 は Arf6 特異的な GAP として働き、マウス海馬神経細胞の神経突起伸長を制御する 第 14 回生命科学研究会、三浦

Yohei Y, Hongu T, Yamaguchi H, Funakoshi Y, Ohbayashi N, Kanaho Y (2015) The Arf6-specific GTPase-activating protein ARAP3 regulates breast cancer cell invasion. Tsukuba Global Science Week 2015, Tsukuba

大林典彦、丸橋総史郎、福田光則 (2015) RUTBC1 は Rab32/38 の不活性化を通してメラニン合成酵素の輸送を調節する 第 88 回日本生化学会大会、神戸

丸橋総史郎、大林典彦、福田光則 (2015) 新規 Varp 結合分子・RACK1 は Varp の安定化を介してメラノサイトのデンドライト伸長に関与する 第 88 回日本生化学会大会、神戸

山内庸平、本宮綱記、山口英樹、船越祐司、大林典彦、金保安則 (2015) 癌細胞浸潤における Arf6 GTPase 活性化因子 ARAP3 の機能解析 第 88 回日本生化学会大会、神戸

Ishida M, Ohbayashi N, Fukuda M (2015) The molecular mechanisms of anterograde melanosome transport on microtubules in mammalian melanocytes. The 2015 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego, CA

〔図書〕(計 2件)

大林典彦、金保安則(2015)
小胞輸送
生体の科学、医学書院、482-483

石田森衛、大林典彦、福田光則(2015)
メラノソーム形成とケラチノサイトへの輸送 色素細胞第2版、慶應義塾大学
出版会、44-58

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000003753>

6. 研究組織

(1) 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