



Rab ファミリータンパク質による膜輸送制御の特異性と多様性

はじめに

Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質 Rab は、酵母から哺乳動物に至るまで全ての真核生物に普遍的に保存されており、細胞内の膜（小胞）の輸送を制御すると考えられている¹⁾。Rab は GDP を結合した不活性化型と GTP を結合した活性化型をサイクリングすることにより膜輸送の制御に関与する（図 1A）。不活性化型の Rab は、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）により活性化型に変換され、活性化型の Rab は GTP アーゼ活性化タンパク質（GAP）により不活性化される。活性化型の GTP-Rab は単独で機能するのではなく、エフェクター（effector）と呼ばれる特異的なパートナーと結合することにより膜輸送を促進すると考えられている。Rab は膜輸送の制御因子の中で最大のファミリーを形成し、そのアイソフォーム数は生物種ごとに大きく異なる。例えば、出芽酵母では 11 種類、線虫やショウジョウバエでは 29 種類、シロイヌナズナでは 59 種類、ヒトやマウスでは 60 種類以上（Rab1 ~ Rab43 に分類、図 1B）の異なるアイソフォームが存在することが知られている²⁾。興味深いことに、これらのアイソフォームの中で酵母からヒトまで進化的に保存されているのは僅か 5 種類で、残りの大多数は種（あるいは脊椎動物）特異的なものである。すなわち、これら大部分の Rab は細胞が細胞として生きて行くために必要なもの（housekeeping な役割）ではなく、何らかの特殊な機能を担うものと推察される。一般的に、低分子量 G タンパク質はこれまでに得られている Ras の解析結果から活性化型（あるいは不活性化型）固定化変異体（constitutive active (CA) or negative (CN)）の作成が可能のため、過剰発現により細胞への影響を検討することが可能である。しかしな

がら、ヒトやマウスに存在する Rab のアイソフォーム数は非常に多いため、他の低分子量 G タンパク質に比べてこの種の機能解析がこれまで立ち後れていた。

最近、ヒトやマウスに存在するほぼ全ての Rab を対象とした比較解析ツールが作成され、ゲノムワイドでの Rab の網羅的解析がある程度可能になってきた³⁻⁵⁾。本稿では、筆者らがこれまで取り組んできた「Rab の網羅的解析ツール（Rab panel）」の作成と、このツールを用いて明らかにできた Rab27A とそのエフェクター分子群による膜輸送制御の特異性と多様性を中心に、最近の知見を紹介する⁶⁾。

1. Rab の網羅的解析ツール（Rab panel）の確立

これまでの Rab エフェクターに関する研究では、Rab とエフェクター分子の結合特異性は数個から多くとも 10 個程度の Rab を調べた程度で、Rab 結合特異性の検討は必ずしも十分とは言えなかった。このため、ある種の Rab に対するエフェクターとして同定されたものが、実は *in vivo* では他の Rab エフェクターとして機能する、あるいは複数の Rab と結合する事例が報告されるようになってきた^{3,7)}。筆者らは、まずマウス（あるいはヒト）に存在する 60 種類の Rab の cDNA を全てクローニングし、Rab を網羅的に比較解析するシステム（Rab panel）の開発に取り組んだ^{3,8,9)}。具体的には、野生型（WT）、CA 変異体、CN 変異体に緑色蛍光タンパク質（GFP）タグ⁸⁾、グルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST）タグ（未発表データ）、FLAG タグ³⁾、GAD（Gal4-activating domain）⁹⁾などを付加した約 700 種類の Rab 解析ツールを作成した。

筆者らはまず、副腎髄質クロマフィン細胞由来の PC12 細胞における、ホルモン（有芯）顆粒の開口放出に関わる Rab の同定にこの Rab panel を応用してみた⁸⁾。60 種類の GFP-Rab を神経成長因子で神経細胞様に分化させた PC12 細胞に発現させ、ホルモン顆粒が集積する神経突起の先端部にターゲットするものをスクリーニングした。その結果、8 種類の Rab アイソフォーム（3A/B/C/D, 27A/B, 33A, 37）がホルモン顆粒上に局在することが明らかになった（図 2A）。アイソフォーム特異的な抗体を用いた解析から、PC12 細胞には少なくとも 3 種類の Rab（3A/27A/33A）が内在性に発現することが確認された。RNA 干渉法によるノックダウン実験から、Rab3A と Rab27A はホルモン顆粒の細胞膜へのドッキングのステップに協調的に関与しており、Rab3A と Rab27A の両方をノックダウンした細胞ではホルモン分泌が顕著に減少することを見いだした。これに対し、Rab33A のノックダウンではホルモン分

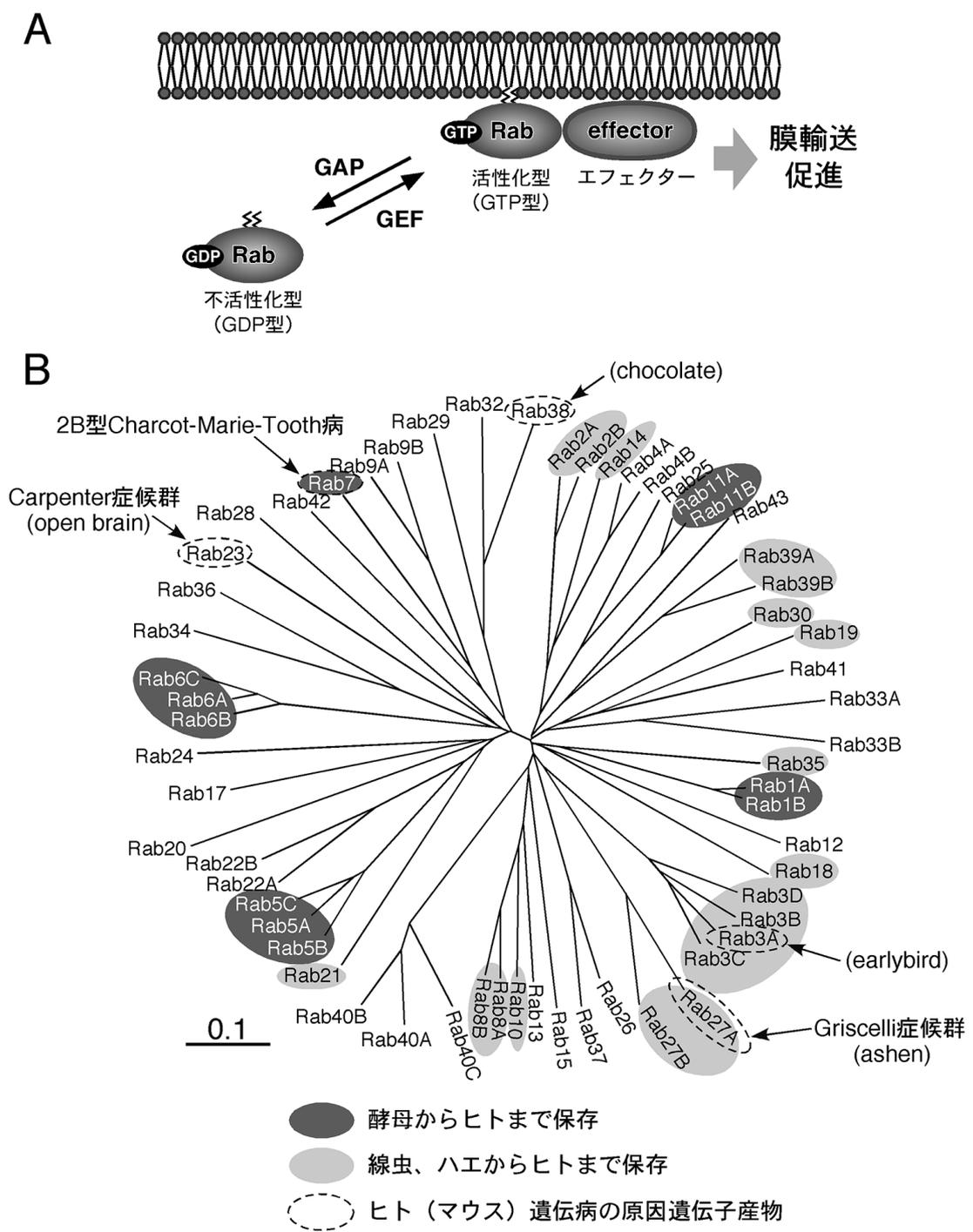


図1 Rabファミリーの系統樹
 (A) Rabファミリータンパク質の膜輸送における役割. (B) CLUSTALWプログラムにより作成したマウスおよびヒトに存在する60種類のRabファミリータンパク質の系統樹を示す. 酵母からヒトまで保存されたRabを濃い灰色で、線虫、ハエからヒトまで保存されたRabを薄い灰色で示す. ヒトあるいはマウスの遺伝病の原因遺伝子産物として同定されているRabを点線で示す.

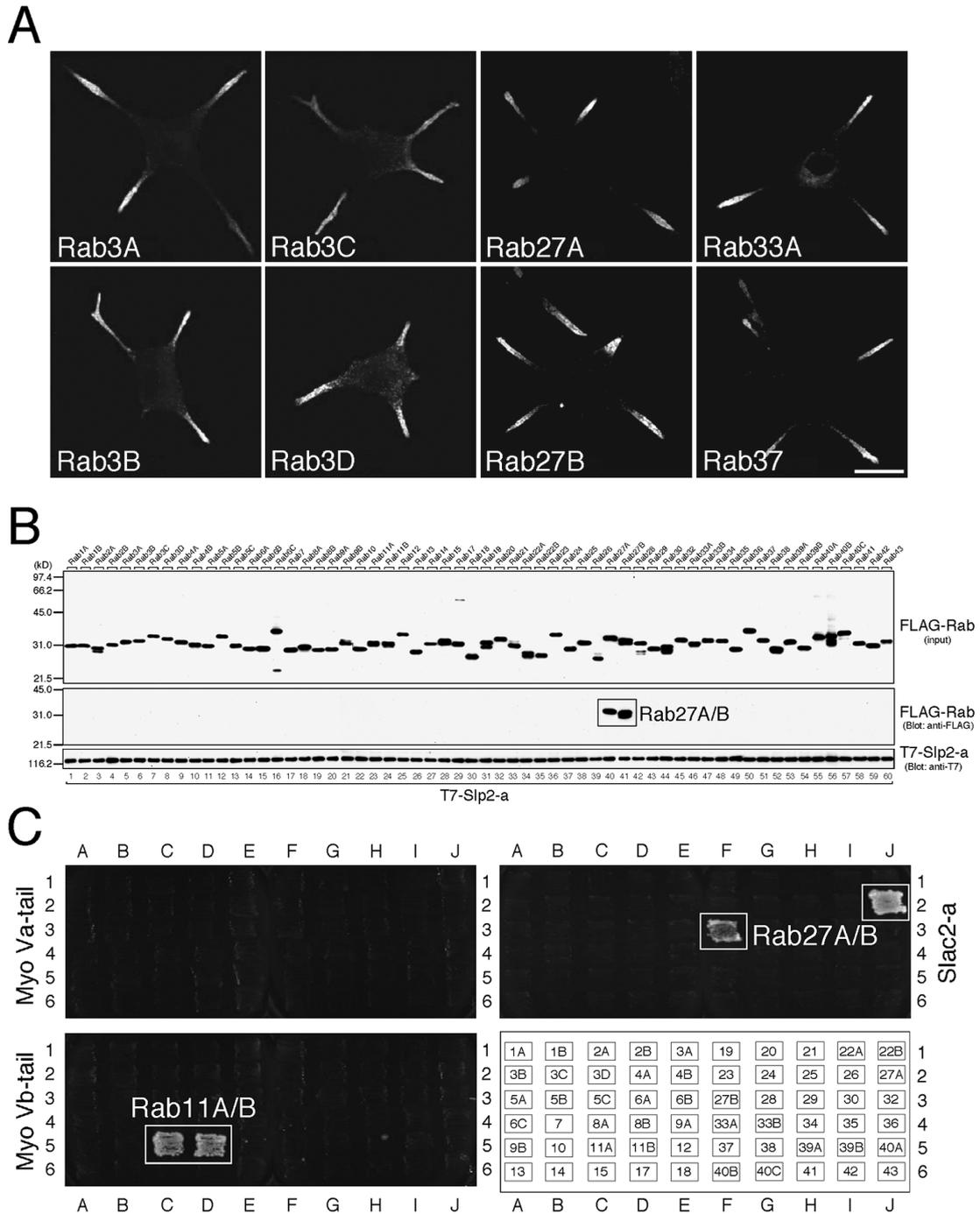


図2 Rabファミリーの網羅的解析ツール (Rab panel)
 (A) 60種類のGFP-Rabを用いたホルモン顆粒ヘターゲットするRabアイソフォームのスクリーニング[®]。神経成長因子で分化させたPC12細胞では、ホルモン顆粒は突起の先端部に集積する。スケールバー、20 μ m。
 (B) FLAG-Rabを用いた免疫沈降法によるSlp2-a分子と60種類のRabとの結合特異性の検討。(C) 酵母two-hybrid法によるSlac2-a分子およびミオシンVa/b分子と60種類のRabとの結合特異性の検討。

泌に特に影響は見られなかった。

Rab3Aは、1990年代初めからシナプス小胞などの分泌小胞に豊富に存在するRabとして注目されており、10年以上前にrabphilinを含む複数のRab3Aエフェクター分子が同定されている。これに対し、Rab27Aの注目度はRab3Aに比べかなり低く、2000年までは日陰の存在であった。Rab27Aが脚光を浴びるようになったきっかけは、色素異常や分泌異常の症状を示すヒト遺伝病Griscelli (GS) 症候群の原因遺伝子産物がRab27Aであるという報告であった¹⁰⁾。現在では幾つかのRabアイソフォームの変異により遺伝病が発症することが知られているが(図1B)、Rab27Aは当時、ヒト遺伝病との関連性が示された初めてのRabであった。Rab27Aは、メラノサイトのメラノソーム(メラニン色素含有小胞)や細胞傷害性T細胞や内分泌細胞などの分泌顆粒上に局在しており¹¹⁾、異なるタイプの膜輸送(メラノソーム輸送と分泌)を制御するものと考えられた。では、Rab27Aはどのようにして上述のホルモン顆粒を細胞膜につなぎ止めて分泌を促進し、どのようにメラノソームの輸送を制御するのであろうか？

Rab27Aの機能の多様性を考える上で、Rab27Aエフェクターの同定が不可欠であり、多くの研究者が当時この研究テーマに取り組んでいた。幸運なことに、筆者らはRab panelを用いてRab27A(およびRab27B)に特異的に結合するタンパク質群としてSlp(スリップ:synaptotagmin-like protein)とSlac2(スラックツー:Slp homologue lacking C2 domains)の同定に世界に先駆けて成功した^{3,6)}。我々が同定したRab27A結合タンパク質は、いずれもアミノ末端側にSHD(Slp homology domain)と命名した共通のドメイン構造を持ち、ここに活性化型のGTP-Rab27A/Bが特異的に結合する(図2BC)³⁾。また、これまでRab3Aエフェクターと考えられてきたrabphilinやNoc2が⁸⁾、実はRab27にも高親和性に結合することが確認された³⁾。

2. Rab27Aとそのエフェクター分子群による多様な膜輸送制御の分子メカニズム

これまでの解析で、ヒトやマウスにおいては5種類のSlp1~5、3種類のSlac2-a~c、rabphilin、Noc2、Munc13-4の11種類のRab27Aエフェクター分子の存在が明らかになっている⁶⁾。Rab27Aがどのようにこれらの結合パートナーを使い分けているのかを明らかにするため、筆者らはメラノサイトおよびPC12細胞で発現するRab27Aエフェクターの機能解析を行った。その結果、メラノサイトにおいてはSlp2-aとSlac2-a/melanophilinの2種類が¹²⁾、PC12

細胞においてはrabphilin、Slp4-a/granophilin-aなど全く異なるタイプのRab27Aエフェクターが発現していること^{13,14)}が明らかとなった。

メラノサイトにおいては、上述の2種類のRab27Aエフェクターが連続的且つ秩序立って機能することによりメラノソームを輸送する(図3左)。まずSlac2-a分子がSHDを介してメラノソーム上のRab27Aと、そしてミオシン結合ドメイン(MBD)を介してアクチン依存性のモータータンパク質ミオシンVaとを同時に結合し、3者複合体を形成してメラノソーム輸送を行う。Rab27AやSlac2-aを欠損するGS患者ではこの3者複合体の形成ができないため、メラノソームが核周辺に蓄積してGS特有の色素異常の症状を示す。蛇足ではあるが、ヒトやマウスには3種類のV型ミオシン(a/b/c)が存在するが、それぞれのカーゴ認識機構は異なると考えられる。ミオシンVaはカーゴレセプターであるSlac2-aを介してRab27Aと相互作用するが、ミオシンVbは直接Rab11A/Bという別のRabを認識する(図2C)。アクチン依存性のメラノソーム輸送が終了すると、もう一つのRab27AエフェクターSlp2-aがSHDを介してメラノソーム上のRab27Aと、そしてC2Aドメインを介して細胞膜内のホスファチジルセリン(PS)とを同時に結合し、メラノソームを細胞膜につなぎ止める¹²⁾。

Rab27A(あるいはRab27B)は、メラノソーム輸送以外にも様々な細胞種の分泌現象(内分泌細胞、耳下腺などの外分泌細胞、マスト細胞、血小板など)への関与が示唆されている⁶⁾。本稿では、誌面の関係でこれら全てを紹介することはできないので、最も解析が進んでいるPC12細胞からのホルモン分泌に焦点を当てる。PC12細胞に内在性に発現するrabphilinやSlp4-aをPC12細胞に過剰発現させると、細胞膜に結合したホルモン顆粒数が顕著に増大するが^{13,14)}、それ以外のSlpではこのような効果は認められない。rabphilinとSlp4-aは共通のドメイン構造を有し(図3右:アミノ末端側のRab結合ドメインとカルボキシル末端側のタンデムC2ドメイン)、共に細胞膜上のホルモン顆粒数を増大させるが、前者はホルモン分泌(開口放出)を促進するのに対し、後者は強い阻害作用を示す。rabphilinはC2Bドメインを介して細胞膜上のt-SNAREの一種であるSNAP-25と結合することによりホルモン顆粒の細胞膜へのつなぎ止めとその後のホルモン分泌を促進するのに対し¹³⁾、Slp4-aはリンカードメイン(SHDとC2Aドメインの間の領域)を介してsyntaxin-1a・Munc18-1と結合し、分泌小胞の細胞膜へのつなぎ止めを促進するが、ホ

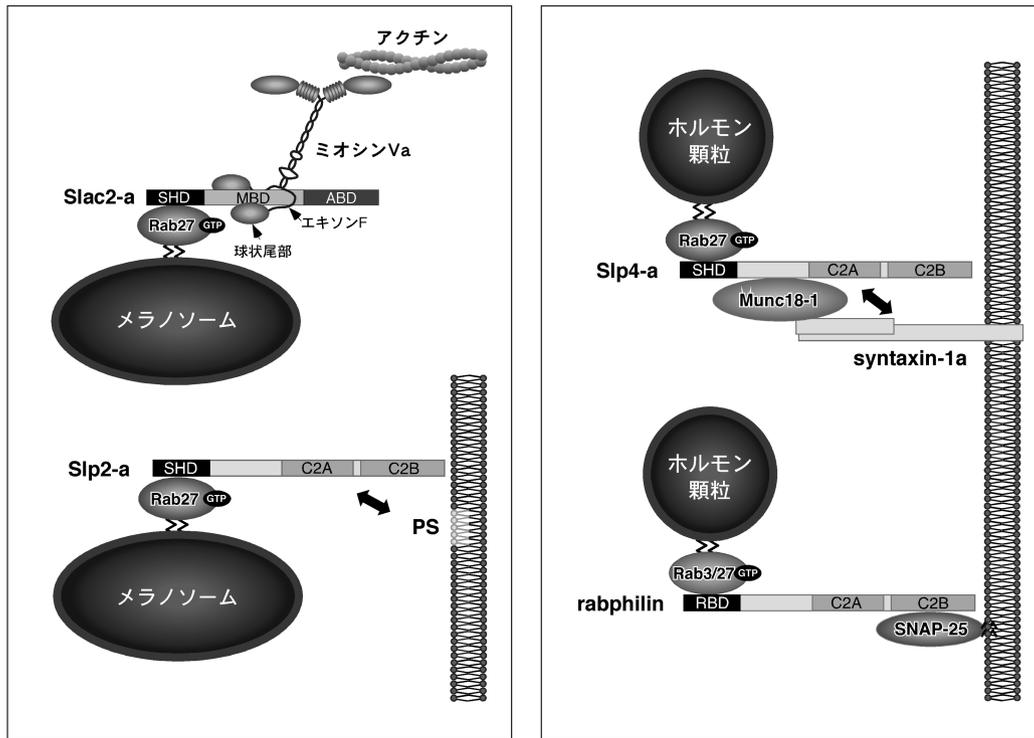


図 3 Rab27 エフェクターによる膜輸送制御の特異性と多様性

(左図) Rab27A・Slac2-a・ミオシン Va 複合体によるアクチン依存性メラノソーム輸送と Rab27A・Slp2-a・ホスファチジルセリン (PS) 複合体によるメラノソームの細胞膜へのつなぎ止めの分子機構¹²⁾。
 (右図) Slp4-a・Munc18-1・syntaxin-1a 複合体および rabphilin・Rab3A/27A・SNAP-25 複合体によるホルモン顆粒の細胞膜へのつなぎ止めの分子機構^{13,14)}

ルモン顆粒の開口放出は抑制すると考えられている¹⁴⁾。このように、Rab27A は細胞種特異的なエフェクター分子と結合することにより、異なるタイプの膜輸送 (メラノソーム輸送と分泌など) の制御が可能になったと考えられる。

終わりに

本稿では、筆者らが作成した Rab の網羅的解析ツールと、それらに応用した Rab27A エフェクター分子の機能解析について概説してみた。Rab を介する膜輸送の分子メカニズムは未知の部分が多く、筆者らが確立した Rab の網羅的解析ツールが今後の研究の発展に貢献することを期待したい。現在筆者らは、Rab panel を用いて Rab エフェクターの網羅的スクリーニングにも着手している。まだ予備的な段階ではあるが、Rab とエフェクター分子の結合は必ずしも 1:1 ではなく、一つの Rab に複数個のエフェクター分子が存在するだけでなく、一つの Rab エフェクターが複数個の異なる Rab と結合するケースがかなりあることが分かってきた (未発表データ)。すなわち、Rab

と Rab エフェクターの相互作用はこれまで考えられていた以上に複雑で、一つの Rab エフェクターが複数の Rab を乗り換えて行くことにより膜輸送を秩序だてて行う可能性も十分に考えられる。今後、この可能性についても検討して行く予定である。

つい最近、Rab の不活性化因子である Rab-GAP を用いた Rab の解析法が報告された。ヒトやマウスのゲノム上には Rab-GAP 活性を持つと推定される TBC (Tre-2/Bub-2/Cdc16) ドメインを持つタンパク質が 40 種類以上存在している。この数は Rab のアイソフォーム数に匹敵することから、それぞれの TBC 含有タンパク質は何らかの Rab-GAP として機能するのではないかと考えられている。Rab-GAP は基質となる活性化型の Rab と特異的に結合すると予想され、Rab-GAP と Rab (CA) 変異体との物理的結合 (酵母 two-hybrid 法) を指標として Rab-GAP のスクリーニングが行われ、幾つかの Rab-GAP が同定された^{5,9)}。また、特定の膜輸送 (メラノソーム輸送や志賀毒素 (Shiga toxin) の取り込み) に対する Rab-GAP の影響を網羅的に検討す

ることにより、特定の Rab に対する GAP の同定も行われた^{15,16)}。例えば、筆者らは Rab27A がメラノソーム輸送に必須であることに着目し、メラノソームの輸送阻害を指標にして Rab27A-GAP の同定に成功している。近い将来、本稿で取り上げた Rab と Rab-GAP の網羅的解析ツールを組み合わせることで、未だ Rab の関与が示唆されていない生命現象（膜輸送）の分子基盤の解明にも取り組んでいきたい。

謝辞

本稿で紹介した Rab27 エフェクターの解析および Rab panel の作成に尽力してくれた研究室のメンバーおよび共同研究者の皆様に感謝致します。

- 1) Zerial, M. & McBride, H. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 107-117.
- 2) Pereira-Leal, J.B. & Seabra, M.C. (2001) *J. Mol. Biol.*, **313**, 889-901.
- 3) Fukuda, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 15373-15380.
- 4) Heo, W.D. & Meyer, T. (2003) *Cell*, **113**, 315-328.
- 5) Haas, A.K., Fuchs, E., Kopajtich, R., & Barr, F.A. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 887-893.
- 6) Fukuda, M. (2005) *J. Biochem.*, **137**, 9-16.
- 7) Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., & Lambright, D.G. (2005) *Nature*, **436**, 415-419.
- 8) Tsuboi, T. & Fukuda, M. (2006) *J. Cell Sci.*, **119**, 2196-2203.
- 9) Itoh, T., Satoh, M., Kanno, E., & Fukuda, M. (2006) *Genes Cells*, **11**, 1023-1037.
- 10) Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., & de Saint Basile, G. (2000) *Nat. Genet.*, **25**, 173-176.
- 11) Tolmachova, T., Anders, R., Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., Huxley, C., & Seabra, M.C. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 332-344.
- 12) Kuroda, T.S. & Fukuda, M. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1195-1203.
- 13) Tsuboi, T. & Fukuda, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 39253-39259.
- 14) Tsuboi, T. & Fukuda, M. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 2101-2112.
- 15) Itoh, T. & Fukuda, M. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 31823-31831.
- 16) Fuchs, E., Haas, A.K., Spooner, R.A., Yoshimura, S., Lord, J. M., & Barr, F.A. (2007) *J. Cell Biol.*, **177**, 1133-1143.

福田 光則

(東北大学大学院生命科学研究所生命機能科学専攻
膜輸送機構解析分野)

Specificity and diversity of Rab family GTPases in membrane traffic

Mitsunori Fukuda (Laboratory of Membrane Trafficking

Mechanisms, Department of Developmental Biology and Neurosciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Aobayama, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

ADAM ファミリータンパク質のドメイン構造

1. はじめに

各種サイトカイン・増殖因子は膜貫通領域を持つ前駆体として細胞表面に発現された後、細胞外プロテアーゼによる切断により活性化され、細胞間のシグナル伝達を担う。ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリータンパク質はこのような細胞表層でのプロテオリシスに関与する分子として知られ、また他方で細胞外環境でのタンパク質間相互作用にも寄与し、発生・分化の過程や様々な病態への関与が示唆されている一群のタンパク質である。哺乳類 ADAM の多くは分子 C 末端側に膜貫通領域を持つ I 型膜タンパク質で、亜鉛イオンを触媒部位に持つプロテアーゼドメイン、血小板凝集阻害物質ディスインテグリンと相似のドメインなど細胞外に特徴的なドメインを持つモジュラータンパク質である。興味深いことにマムシやハブなどの出血性のヘビ毒には膜型 ADAM の細胞外ドメイン部に相当するタンパク質が数多く存在し、これらは出血による主要な致死因子（出血因子）として知られている。最近、筆者らはヘビ毒由来のこれら哺乳類 ADAM ホモログの X 線結晶構造解析に成功した^{1,2)}。本稿では ADAM ファミリーに共通したドメイン構造について紹介する。

2. ADAM ファミリータンパク質

1992 年に受精の膜融合に関わる分子として最初の哺乳類由来 ADAM, ファーティリンが報告された³⁾。精子先端の細胞膜に発現するこの分子の中には RGD 配列は含まれないものの、ハブなどの出血性ヘビ毒に見出されたディスインテグリンと非常に相同性の高い領域が含まれ、インテグリンを介した精子-卵間相互作用の可能性に興味を持たれた（特徴的な突き出たループ部に RGD 配列を持つディスインテグリンは血小板上の主要なフィブリノーゲン受容体であるインテグリン α Ib β 3 に結合し、インテグリンへのフィブリノーゲン結合を阻害することで血小板凝集を阻