

学位論文題名

Slp and Slac2, novel Rab27A effectors that control membrane transport

（膜輸送を制御する新規Rab27AエフェクターslpおよびSlac2の同定）

学位論文内容の要旨

細胞内には様々な脂質二重層に包まれたオルガネラが存在し、それらの多くは小胞輸送を介して情報交換を行っている。小胞輸送は数多くの因子が関与することが知られているが、生体内の膜輸送のメカニズムは各組織ごと、あるいは各オルガネラごとに特殊化したメカニズムを有しているため非常に多様性に富んでおり、未だ見つかっていない制御因子が多数存在すると考えられている。

シナプトタグミンは神経細胞におけるシナプス小胞のカルシウムセンサーとして知られており、神経終末のエキソサイトーシスを司る分子の1つである。シナプトタグミンは N 末端側に膜貫通領域を有しており、また C 末端側にはカルシウムおよびリン脂質の結合ドメインである C2 ドメインを2つ有している。シナプトタグミンは主に神経系で機能するが、非神経系の他の細胞、組織で働くシナプトタグミンはこれまであまり明らかではなく、シナプトタグミンファミリーの何らかの分子、あるいはシナプトタグミンに類似したタンパク質が存在し、非神経系での小胞輸送を制御している可能性が考えられた。

そこで本研究では、小胞輸送を制御する新たなタンパク質の同定を目的としてデータベース検索と RT-PCR を行い、シナプトタグミン様タンパク質 Slp (synaptotagmin-like protein) および Slac2 (Slp homologue lacking C2 domains) を新規に同定した。またこれらのタンパク質の膜輸送における機能解析、特にメラニンを運ぶ小胞、メラノソームの輸送に焦点を当てて解析を行った。

第1章 Slp および Slac2 の SHD は新規 Rab27A 結合ドメインである

Slp および Slac2 蛋白質の1次構造

ヒトおよびマウスにおいて、Slp ファミリーは5つの分子 (Slp1～Slp5) から構成されている。Slp は C 末端側に C2 ドメインを2個持つ点でシナプトタグミンと共通しているが、N 末端にシナプトタグミンとは異なる Slp 特有の相同領域 SHD (Slp homology domain) を有している。また SHD は有しているが C2 ドメインを持たない蛋白質として、Slac2 の3つの分子 Slac2-a から Slac2-c もまた同定した。Slac2-a と Slac2-c は中央部、C 末端側に1つずつ保存されたドメインを有している一方、Slac2-b にはそのようなドメインは存在していなかった。

SHD 結合蛋白質のスクリーニング

Slp、Slac2 は N 末端側に SHD を有しているが、このドメインがどのような機能を持つ

のかは全く明らかではなかった。唯一の情報、SHD が Noc2、Rabphilin、RIM といった既存の Rab3A 結合ドメインと低い相同性を示した事であった。Rab 蛋白質はヒトでは 60

種類以上の存在が確認されているが、それぞれの Rab に対する特異的な結合蛋白質 (Rab エフェクター) はあまり分かっていない。そこで私は SHD が何らかの Rab 蛋白質の結合ドメインとして機能するのではないかという仮説を立てて検討した。細胞内で発現させた 20 種類の Rab 蛋白質を用いて、GST pull-down 法により SHD に結合する Rab 蛋白質のスクリーニングを行った。その結果、Slp4-a を除く殆どの Slp、Slac2 は Rab27A に特異的に結合した。また Slp、Slac2 は GTP 結合型 (活性化型) の Rab27A に直接結合する事も明らかとなった。

第 2 章 Slac2-a、Rab27A、myosin Va、actin 複合体はメラノサイトにおけるメラノソーム輸送に必要である

ヒト Griscelli syndrome の原因遺伝子産物、Rab27A と myosin Va

Griscelli syndrome は毛髪や肌の色素異常、免疫不全、神経障害を症状とするヒトの常染色体劣性遺伝性疾患である。Griscelli syndrome 患者の色素異常はメラノサイトに存在するメラノソームというメラニン色素を運ぶ小胞 (オルガネラ) の異常蓄積が非常に特徴的である。正常なメラノサイトではメラノソームは微小管とアクチン線維によって細胞膜周辺に運ばれるのに対して、Griscelli syndrome 患者のメラノサイトでは正しい輸送が行われず、メラノソームは核周辺に蓄積するためである。近年 Griscelli syndrome の原因遺伝子産物が Rab27A と myosin Va であることが明らかとなったが、なぜこれらの遺伝子の欠損で発症するのかという分子機構は不明であった。

Slac2-a、Rab27A、myosin Va、actin からなる 4 者複合体の同定

Rab27A と myosin Va はメラノソーム輸送過程において間接的に結合する事が示唆されていたが、両者を結びつける分子はこれまで明らかにされていなかった。そこで Rab27A の結合タンパク質である Slp あるいは Slac2 のいずれかが myosin Va と結合し、両者を結びつけるのではないかと考え検討した。その結果、Slac2-a が myosin Va と結合することが明らかとなった。さらにこれらの解析をしている中で、Slac2-a の C 末端部分に強く結合するタンパク質が存在することがわかり、その後の解析によりこのタンパク質が actin であることが明らかとなった。

Slac2-a dominant negative 変異体導入によるメラノソーム輸送異常

メラノソーム輸送過程において Slac2-a が Rab27A、myosin Va、actin の全てと結合する必要があるのか確かめるために、Slac2-a の dominant negative 変異体を用いて解析を行った。GFP を融合した Slac2-a wild type をメラノサイトに導入すると、メラノソームは細胞膜周辺へと正常に分布し、GFP-Slac2-a、Rab27A、myosin Va の 3 者はメラノソーム上で共局在した。一方、Rab27A、myosin Va、actin のいずれかとの結合が損なわれた Slac2-a の点変異体を導入したところ、いずれの場合もメラノソームは核周辺に蓄積し、Slac2-a、Rab27A、myosin Va の 3 者の共局在も見られなくなった。このことから、メラノソームの微小管からアクチン線維への受け渡しには Slac2-a に Rab27A、myosin Va、actin の全てが結合する必要があることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 助 教 授 松 本 健 一
副 査 助 教 授 井ノ口 仁 一

学 位 論 文 題 名

Slp and Slac2, novel Rab27A effectors that control membrane transport

(膜輸送を制御する新規Rab27AエフェクターslpおよびSlac2の同定)

細胞内には様々な脂質二重層に包まれたオルガネラが存在し、それらの多くは小胞輸送を介して情報交換を行っている。小胞輸送は数多くの因子が関与することが知られているが、生体内の膜輸送のメカニズムは各組織ごと、あるいは各オルガネラごとに特殊化したメカニズムを有しているため非常に多様性に富んでおり、未だ見つかっていない制御因子が多数存在すると考えられている。

シナプトタグミンは神経細胞におけるシナプス小胞のカルシウムセンサーとして知られており、神経終末のエキソサイトーシスを司る分子の1つである。シナプトタグミンはN末端側に膜貫通領域を有しており、またC末端側にはカルシウムおよびリン脂質の結合ドメインであるC2ドメインを2つ有している。シナプトタグミンは主に神経系で機能するが、非神経系の他の細胞、組織で働くシナプトタグミンはこれまであまり明らかではなく、シナプトタグミンファミリーの何らかの分子、あるいはシナプトタグミンに類似したタンパク質が存在し、非神経系での小胞輸送を制御している可能性が考えられた。

そこで本研究では、小胞輸送を制御する新たなタンパク質の同定を目的としてデータベース検索とRT-PCRを行い、シナプトタグミン様タンパク質Slp (synaptotagmin-like protein) およびSlac2 (Slp homologue lacking C2 domains) を新規に同定した。またこれらのタンパク質の膜輸送における機能解析、特にメラニンを運ぶ小胞、メラノソームの輸送に焦点を当てて解析を行った。

第1章 Slp および Slac2 の SHD は新規 Rab27A 結合ドメインである

Slp および Slac2 蛋白質の1次構造

ヒトおよびマウスにおいて、Slp ファミリーは5つの分子(Slp1-Slp5)から構成されている。SlpはC末端側にC2ドメインを2個持つ点でシナプトタグミンと共通しているが、N末端にシナプトタグミンとは異なるSlp特有の相同領域SHD (Slp homology domain) を有している。またSHDは有しているがC2ドメインを持たない蛋白質として、Slac2の3つの分子Slac2-aからSlac2-cもまた同定した。Slac2-aとSlac2-cは中央部、C末端側に1つずつ保存されたドメインを有している一方、Slac2-bにはそのようなドメインは存在していなかった。

SHD 結合蛋白質のスクリーニング

Slp、Slac2 は N 末端側に SHD を有しているが、このドメインがどのような機能を持つのかは全く明らかではなかった。唯一の情報、SHD が Noc2、Rabphilin、RIM といった既存の Rab3A 結合ドメインと低い相同性を示した事であった。Rab 蛋白質はヒトでは 60 種類以上の存在が確認されているが、それぞれの Rab に対する特異的な結合蛋白質 (Rab エフェクター) はあまり分かっていない。そこで私は SHD が何らかの Rab 蛋白質の結合ドメインとして機能するのではないかという仮説を立てて検討した。細胞内で発現させた 20 種類の Rab 蛋白質を用いて、GST pull-down 法により SHD に結合する Rab 蛋白質のスクリーニングを行った。その結果、Slp4-a を除く殆どの Slp、Slac2 は Rab27A に特異的に結合した。また Slp、Slac2 は GTP 結合型 (活性化型) の Rab27A に直接結合する事も明らかとなった。

第 2 章 Slac2-a、Rab27A、myosin Va、actin 複合体はメラノサイトにおけるメラノソーム輸送に必要である

ヒト Griscelli syndrome の原因遺伝子産物、Rab27A と myosin Va

Griscelli syndrome は毛髪や肌の色素異常、免疫不全、神経障害を症状とするヒトの常染色体劣性遺伝性疾患である。Griscelli syndrome 患者の色素異常はメラノサイトに存在するメラノソームというメラニン色素を運ぶ小胞 (オルガネラ) の異常蓄積が非常に特徴的である。正常なメラノサイトではメラノソームは微小管とアクチン線維によって細胞膜周辺に運ばれるのに対して、Griscelli syndrome 患者のメラノサイトでは正しい輸送が行われず、メラノソームは核周辺に蓄積するためである。近年 Griscelli syndrome の原因遺伝子産物が Rab27A と myosin Va であることが明らかとなったが、なぜこれらの遺伝子の欠損で発症するのかという分子機構は不明であった。

Slac2-a、Rab27A、myosin Va、actin からなる 4 者複合体の同定

Rab27A と myosin Va はメラノソーム輸送過程において間接的に結合する事が示唆されていたが、両者を結びつける分子はこれまで明らかにされていなかった。そこで Rab27A の結合タンパク質である Slp あるいは Slac2 のいずれかが myosin Va と結合し、両者を結びつけるのではないかと考え検討した。その結果、Slac2-a が myosin Va と結合することが明らかとなった。さらにこれらの解析をしている中で、Slac2-a の C 末端部分に強く結合するタンパク質が存在することがわかり、その後の解析によりこのタンパク質が actin であることが明らかとなった。

Slac2-a dominant negative 変異体導入によるメラノソーム輸送異常

メラノソーム輸送過程において Slac2-a が Rab27A、myosin Va、actin の全てと結合する必要があるのか確かめるために、Slac2-a の dominant negative 変異体を用いて解析を行った。GFP を融合した Slac2-a wild type をメラノサイトに導入すると、メラノソームは細胞膜周辺へと正常に分布し、GFP-Slac2-a、Rab27A、myosin Va の 3 者はメラノソーム上で共局在した。一方、Rab27A、myosin Va、actin のいずれかとの結合が損なわれた Slac2-a の点変異体を導入したところ、いずれの場合もメラノソームは核周辺に蓄積し、Slac2-a、Rab27A、myosin Va の 3 者の共局在も見られなくなった。このことから、メラノソームの微小管からアクチン線維への受け渡しには Slac2-a に Rab27A、myosin Va、actin の全てが結合する必要があることが明らかとなった。

このように、黒田 垂歩は精力的に Rab27A エフェクター Slp および Slac2 の機能解析を行ない、多くの成果をあげた。これらの業績は古澤 誠に博士 (薬学) の学位授与に十分値し、推薦するものである。