

研究題目 RAB タンパク質に対する特異的 holdase の同定と分子機能解析

研究組織

研究代表者：山野晃史（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：小島和華（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

研究分担者：菊池麗香（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

メンブレントラフィックにおいて中心的役割を担う RAB GTPase はヒトではおよそ 60 種類が知られている。RAB タンパク質は GTP に結合した活性型と GDP に結合した不活性型をサイクルする分子スイッチであり、異なるヌクレオチド結合状態で異なるタンパク質と相互作用することが分子スイッチであることの本質である。しかし、GTP に結合した活性型とは異なり、GDP 結合型あるいはヌクレオチドの結合していないアポ型は疎水性に富んだペプチドが外部に露出した不安定な構造をとる。

我々は以前に RAB7A の結合因子として機能未知タンパク質 C5orf51 を同定していた。また、C5orf51 遺伝子をノックアウトした細胞では、内在性の RAB7A タンパク質の量が低下していたため、C5orf51 には不安定な RAB タンパク質に特異的に結合するシャペロンではないかと予想した。そこで本研究では小迫博士との共同研究で、C5orf51 に結合する因子の探索と代表的な RAB タンパク質に対して異なるヌクレオチド状態での結合因子の検索を行い、C5orf51 の機能に迫った。

[1-2]研究の方法・経過

まず機能と局在の異なる 7 種類の RAB (RAB4A, RAB6A, RAB7A, RAB8A, RAB9A, RAB11A, RAB18) について、野生型およびアポ型変異を導入した変異体を HeLa 細胞に発現させた。その後、N 末端に付加した FLAG タグに対する抗体で共免疫沈降を行い、質量分析で相互作用因子を調べた。その結果、RAB7A のアポ型と C5orf51 は強く相互作用することがわかった (Fig1)。

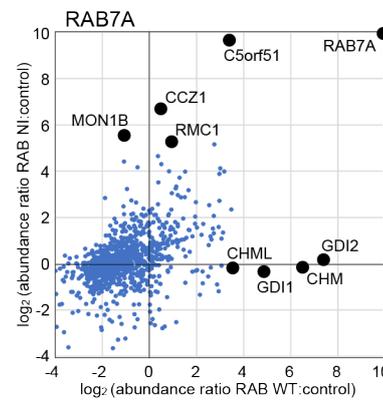


Fig. 1 C5orf51 はアポ型 RAB7A に選択的に結合する

また、その他 6 種類の RAB タンパク質と C5orf51 は、アポ型であっても相互作用しないことが示唆された。次に FLAG タグを付加した C5orf51 を細胞に発現させて、共免疫沈降・質量分析を行うと、RAB7A が相互作用因子として同定された。一般的に RAB7A は活性型でエフェクター分子と、不活性型で GDI や GEF と相互作用する。しかし C5orf51 の質量分析からは RAB7A のみが共沈され、RAB7A と相互作用する既知因子は見出すことができなかった (Fig2)。これは C5orf51 が既知の因子を介することなく、直接 RAB7A と相互作用していることを強く示唆していた。

上記の質量分析を突破口として、我々は生化学的・細胞生物学アプローチで以下の新しい知見を得ることに成功した。

- 1) C5orf51 は 60 種類の RAB タンパク質の中で RAB7A のアポ型でのみ強く結合する。
- 2) RAB7A のアポ型は構造的に不安定となるが、C5orf51 を添加することで、熱に対する変性温度が上昇する。
- 3) 翻訳直後の RAB タンパク質はヌクレオチド

の結合していない非常に不安定な状態で凝集体を形成しやすいが、C5orf51 が RAB7A 特異的シャペロンとして機能し、GTP の取り込みを促進している。

3) C5orf51 を RAB9A/9B とともに欠損した細胞では、RAB7A の存在量が低下し、それに伴い飢餓で誘導されるオートファジーに阻害が見られる。

4) 同様なシャペロン機能をもつタンパク質として RABIF を同定し、そのターゲットとなる RAB タンパク質を複数同定した。

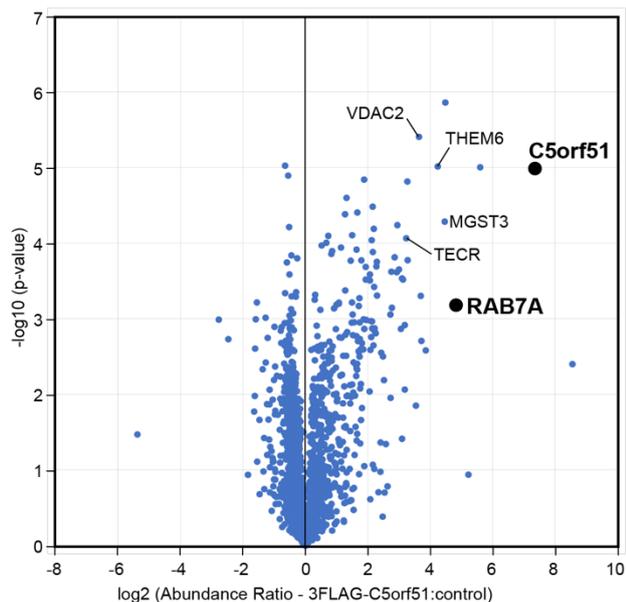


Fig. 2 C5orf51 は RAB7A と特異的に相互作用する

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

上述の一連の実験結果から、翻訳直後の RAB タンパク質は GTP を取り込むまで非常に不安定であり、細胞にはそのような RAB の不安定な状態を回避し、GTP の取り込みを促進する RAB シャペロンが存在することを突き止めた。我々はこのようなシャペロンを RAB Holdase と命名し、現在論文投稿に向けて解析を続けている。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究で我々は RAB7A に対するシャペロンとして C5orf51 を、RAB8A (そのファミリータンパク質) に対するシャペロンとして RABIF を同定した。また、その機能を明らかにして、RAB 特異的シャペロンという概念を提唱した。分子シャペロンは、例えば Hsp70 のように自身が ATP 加水分解エネルギーを使って、広範なタンパク質のフォールディングを補助するものと

して定義されている。我々が明らかにした RAB 特異的シャペロンは厳密な基質選択性があり、RAB シャペロン側ではなく RAB タンパク質側がヌクレオチドと結合する。GTP/GDP 結合によって構造を変換させる分子スイッチは数多く存在するため、そのようなタンパク質についても特異的なシャペロンが存在する可能性が示唆される。今後はそのような観点から解析を進めることで、分子スイッチに対する未知シャペロン分子を同定し、シャペロンの概念を拡充できるものと期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Yamano K. (研究代表者), Okatsu K., Kojima W., Reika K., Kosako H. (共同研究者), Imai K., Fukuda N., Fukai S., Matsuda N.

C5orf51 has a holdase activity for newly synthesized RAB7A to facilitate GTP loading.

投稿準備中

[3-2]学会発表

小島 和華、山野 晃史

ミトコンドリアを軸にしたオートファジー制御因子の機能解析 第 95 回日本生化学会大会 名古屋国際会議場 2022 年 11 月 9 日

山野 晃史

オートファジーアダプターと損傷ミトコンドリア分解 第 74 回日本細胞生物学会大会 タワーホール船堀 2022 年 6 月 28 日

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

引き続き小迫博士と協力して、RAB GTPase に対する新しい相互作用因子を同定することで、分子スイッチにおけるシャペロンの概念を確固たるものにしていきたいと考えている。