令和元年５月９日

報道機関　各位

東北大学大学院生命科学研究科

可溶性蛋白質の分泌を制御する必須因子として Rab6 を同定！

～ゴルジ体での可溶性蛋白質と膜蛋白質の選別に新たな仕組みを示唆～

【発表のポイント】

- 細胞内小胞輸送のマスター制御因子である Rab ファミリーの網羅的なノックアウト細胞株の樹立に成功
- Rab6 ノックアウト細胞で、コラーゲンなどの可溶性蛋白質の細胞外への分泌が阻害（一方、膜蛋白質の細胞膜への輸送には大きな影響無し）
- これまで考えられていたゴルジ体での可溶性蛋白質と膜蛋白質の輸送小胞への選別機構に一石を投じる発見

【概要】

国立大学法人東北大学は、コラーゲンなどの可溶性蛋白質の分泌を制御する必須の因子として Rab6 を同定することに成功しました。これは、東北大学大学院生命科学研究科の本間悠太助教、福田光則教授らによる研究成果です。

私達の体を構成する細胞は、「分泌経路[*1]」と呼ばれる小胞輸送のシステムを用いて可溶性蛋白質を細胞外に放出したり、細胞膜に膜蛋白質などを輸送したりしています。粗面小胞体で合成された可溶性蛋白質や膜蛋白質はゴルジ体に運ばれた後、輸送小胞に積み込まれて、細胞膜まで輸送されます。この際、可溶性蛋白質と膜蛋白質はどちらも同じ輸送小胞に選別されると一般的に考えられていますが、可溶性蛋白質専用の小胞や膜蛋白質専用の小胞が本当に存在しないのかどうかは、これまで実験的に検証されていませんでした。

今回、研究グループは小胞輸送のマスター制御因子である「低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリー[*2]」の網羅的なノックアウト（KO）細胞株のコレクションを世界に先駆けて作製し、Rab6 が可溶性蛋白質の分泌に必須であることを見出しました。一方、Rab6 の KO 細胞でも細胞膜上の膜蛋白質の量には大きな影響が見られなかったことから、膜蛋白質の輸送には可溶性蛋白質の輸送とは異なる仕組みの存在が強く示唆されます。本研究成果は、ゴルジ体での蛋白質の選別機構に一石を投じる発見であり、今後その分子機構が解明されれば、教科書の記載の変更にもつながることが期待されます。

本研究成果は、米国の国際科学誌『*Journal of Cell Biology*』の電子版（2019 年 5 月 9 日付）に掲載されます。

【背景】

私達の体を構成する細胞は、「分泌経路」と呼ばれる小胞輸送のシステムを用いて様々な可溶性蛋白質（例えば、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分*3）を細胞外に放出したり、細胞膜に膜蛋白質（例えば、受容体、イオンチャネル、トランスポーターなど）を輸送したりしています。この分泌経路に関する研究は歴史が深く、2013 年度にはノーベル生理学・医学賞の対象ともなっています。これまでの研究で、粗面小胞体で合成された可溶性蛋白質や膜蛋白質はゴルジ体に運ばれた後、輸送小胞に積み込まれて、細胞膜まで輸送されることが知られています（図1上段、緑矢印）。この際、可溶性蛋白質と膜蛋白質は同じ輸送小胞に選別されると広く信じられており、著名な細胞生物学の教科書にもそのように記載されています（図1下段、『従来モデル』）。しかし、ゴルジ体からの輸送小胞の形成の詳細な仕組みは不明な点も多く、本当にゴルジ体から生まれた可溶性蛋白質を含む小胞と膜蛋白質を含む小胞が同一であるかは、これまで実験的には検証されていませんでした。

【研究成果】

研究グループでは、小胞輸送のマスター制御因子である「低分子量 G 蛋白質 Rab ファミリー」の機能を明らかにするため、CRISPR/Cas9 のゲノム編集技術*4 を用いて、哺乳類に共通して存在する 58 種類全ての Rab 遺伝子のノックアウト（KO）細胞株（腎臓上皮細胞由来の MDCK 細胞*5）の作製に世界に先駆けて成功しました。これらの KO 細胞株を解析したところ、Rab6 の KO 細胞株において、基底膜（上皮細胞の底面に存在する細胞外マトリックス層*3）が欠損していることを見出しました。その後の解析から、Rab6 は可溶性蛋白質全般の分泌に必須であることを含め、以下の知見を得ることができました。

① 細胞外マトリックスのゲルの中で MDCK 細胞を培養すると、3 次元シスト*6 と呼ばれる上皮細胞様の組織を形成します（図2、右下模式図）。その 3 次元シストの形態を詳細に解析した結果、Rab6 の KO 細胞株において、基底膜が欠損していることが明らかになりました（図2、赤枠）。

② 基底膜は、上皮細胞から分泌された可溶性蛋白質によって構成されています。そこで、Rab6 の KO 細胞株において可溶性蛋白質の分泌が阻害されているのではないかと考え、これを生化学的に検討しました。その結果、ラミニンなどの基底膜成分だけでなく（図3左、赤枠）、ほぼ全ての可溶性蛋白質の細胞外への分泌が著しく減少していることが分かりました（図3右、赤枠）。一方、意外なことに、同様な分泌経路で細胞膜へと輸送されるはずの膜蛋白質の量については、定常状態で大きな変化は認められませんでした（図4）。

③ 可溶性のモデル分泌蛋白質（緑色蛍光蛋白質［EGFP］にシグナルペプチド［SS］を付加した SS-EGFP ［図5上段］）を用いてさらに解析を行った結果、Rab6 の KO 細胞株では SS-EGFP の分泌が著しく低下し（図6左）、正しく分泌されなかったものはリソソームで分解を受けることが明らかになりました（図6右）。一方、膜貫通型の

モデル分泌蛋白質（SS-EGFP に膜貫通領域［TM］を付加した SS-EGFP-TM ［図5下段］）は、細胞膜への輸送速度は減少しているものの、細胞膜上へと輸送されることが確認できました（図7）。

以上の結果から、Rab6 は可溶性蛋白質の細胞外への分泌には必須ですが、Rab6 が無くても膜蛋白質の細胞膜への輸送は起こることから、可溶性蛋白質の輸送とは異なる仕組みの存在が強く示唆されます。すなわち、Rab6 の KO 細胞株に見られる可溶性蛋白質の分泌不全の症状は、従来の『可溶性蛋白質と膜蛋白質は同じ輸送小胞に選別されるというモデル』では説明することができず、少なくとも Rab6 非存在下では、『両者が異なる小胞に選別されるという新しいモデル』が提唱できます（図8）。本研究成果に加え、今後、Rab6 に依存しない膜蛋白質の輸送の仕組みが明らかになれば、教科書の記載の書き換えにもつながるものと期待されます。

【今後の展開】

私達の体を構成する細胞は、コラーゲンなど生理学的に重要な様々な分子を細胞外へと放出しています。今後、Rab6 を介する分泌の詳細な分子基盤が明らかになれば、薬剤スクリーニング等による人為的な分泌制御にも発展する可能性を秘めています。また、今回研究グループが作製した「Rab ファミリー遺伝子の KO 細胞株のコレクション」及び「Rab の発現ツール」は、公的なリソース機関（独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター）を介して配布される予定で、分泌以外の様々な細胞内小胞輸送経路の解析にも有用であることから、当該研究分野の発展に大いに貢献するものと期待されます。今後、可溶性蛋白質の放出だけでなく、小胞自身を細胞外に放出する非典型的な分泌（例えば、エクソソーム*7 などの細胞外小胞の分泌）の仕組みの解明にも、この Rab KO コレクションを活用していく予定です。

※本研究成果は、国立研究開発法人科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業（CREST） 細胞外微粒子「細胞外小胞の形成・分泌とその異質性を生み出す分子機構の解明～人工細胞外小胞への展開（JPMJCR17H4）」（研究代表者：福田光則 東北大学大学院生命科学研究科教授）、独立行政法人日本学術振興会・学術研究助成基金助成金 若手研究「低分子量 G タンパク質 Rab6 による可溶性分泌タンパク質の輸送機構の解明（18K14692）」（研究代表者：本間悠太 東北大学大学院生命科学研究科助教）等のサポートによるものです。

【図及び説明】

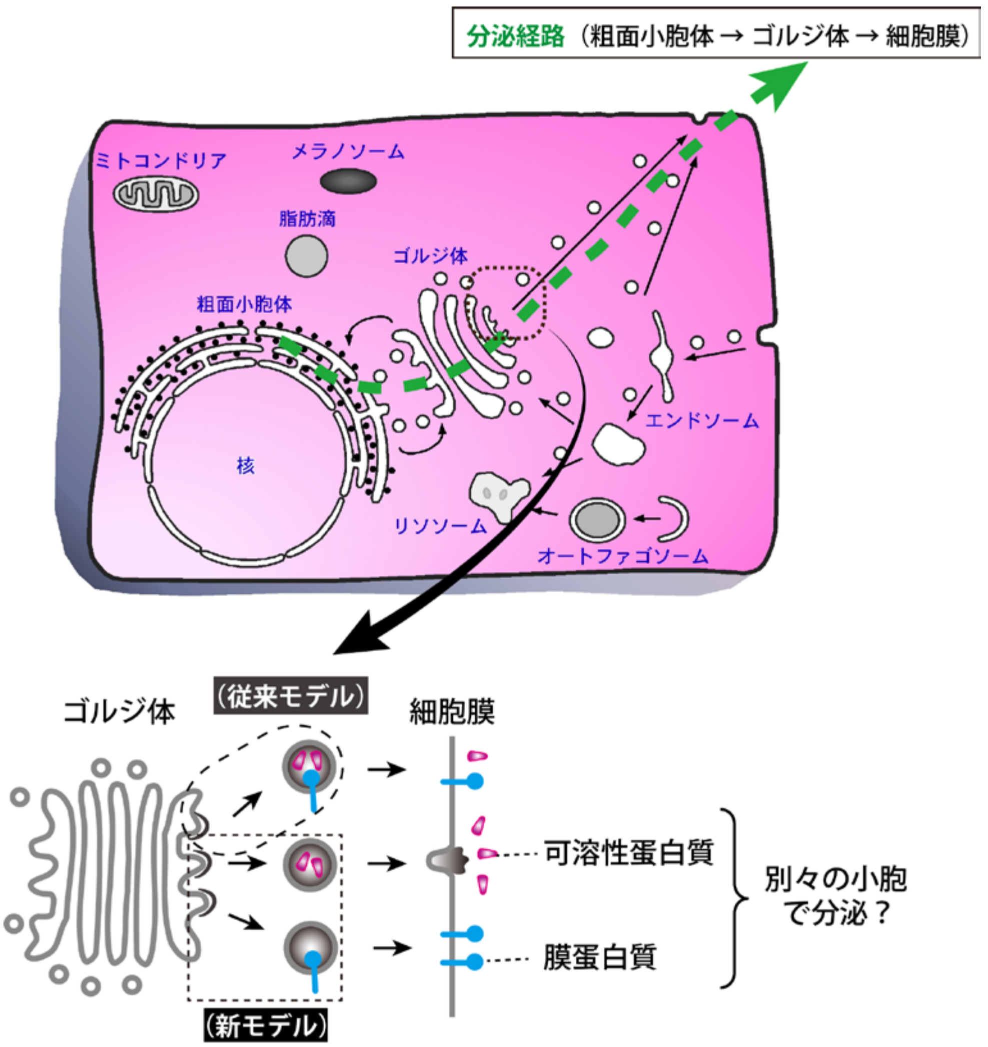

図１　分泌経路の概要とゴルジ体での積み荷分子の輸送小胞への積み込み

（上段）真核細胞の細胞内には、膜で包まれた細胞小器官（オルガネラ）が多数存在しています。これらのオルガネラの間では、小胞を介して物質のやり取りが頻繁に行われており（→）、その輸送経路のネットワークは首都圏の地下鉄網に例えることができます。中でも、最も有名な輸送経路が「分泌経路」（緑色の矢印：粗面小胞体、ゴルジ体を経由して、細胞膜へ積み荷分子を輸送）で、細胞外への可溶性蛋白質の分泌（放出）や、膜蛋白質の細胞膜への輸送の役割を担っています。

（下段）粗面小胞体から運ばれてきた積み荷分子は、ゴルジ体で糖鎖などの修飾を受けた後、輸送小胞へと選別され、目的地の一つである細胞膜へと輸送されます。この時、可溶性蛋白質（小胞の内部に存在：ピンク色）と膜蛋白質（小胞の膜に突き刺さって存在：水色）は同じ輸送小胞に選別されると広く信じられています（従来モデル）。しかし、両者が実際に同じ小胞に選別されているという確証はこれまで得られていませんでした。今回の発見では、少なくとも膜蛋白質は可溶性分子とは別個の小胞で細胞膜へと輸送されることが強く示唆されています。

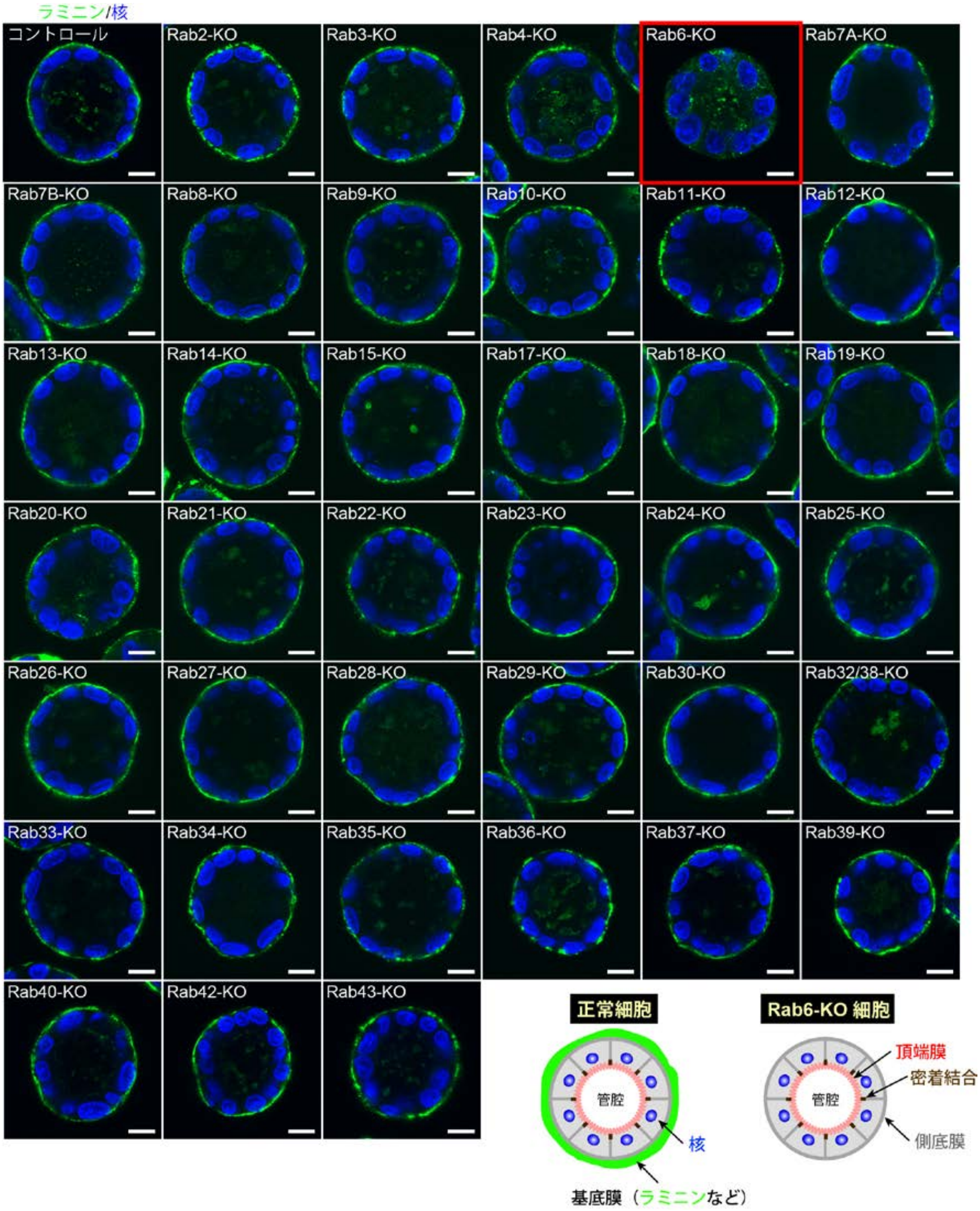

図２　上皮細胞様に分化させた MDCK 細胞（3 次元シスト）における基底膜の形成

MDCK 細胞を細胞外マトリックス中で培養すると、3 次元シストと呼ばれる内部に中空構造（管腔）を持った上皮細胞様の組織を形成します（右下の模式図）。この 3 次元シストは、頂端膜（赤色）、側底膜（灰色）、密着結合（茶色）といった上皮細胞に特有の構造を持ち、側底膜側から細胞外へとラミニンなどの可溶性タンパク質を分泌し、基底膜を形成（緑色）することが知られています。全ての Rab の KO 細胞を解析したところ、Rab6 の KO 細胞でのみ緑色の基底膜が消失していました（赤枠）。スケールバー＝10 μm。

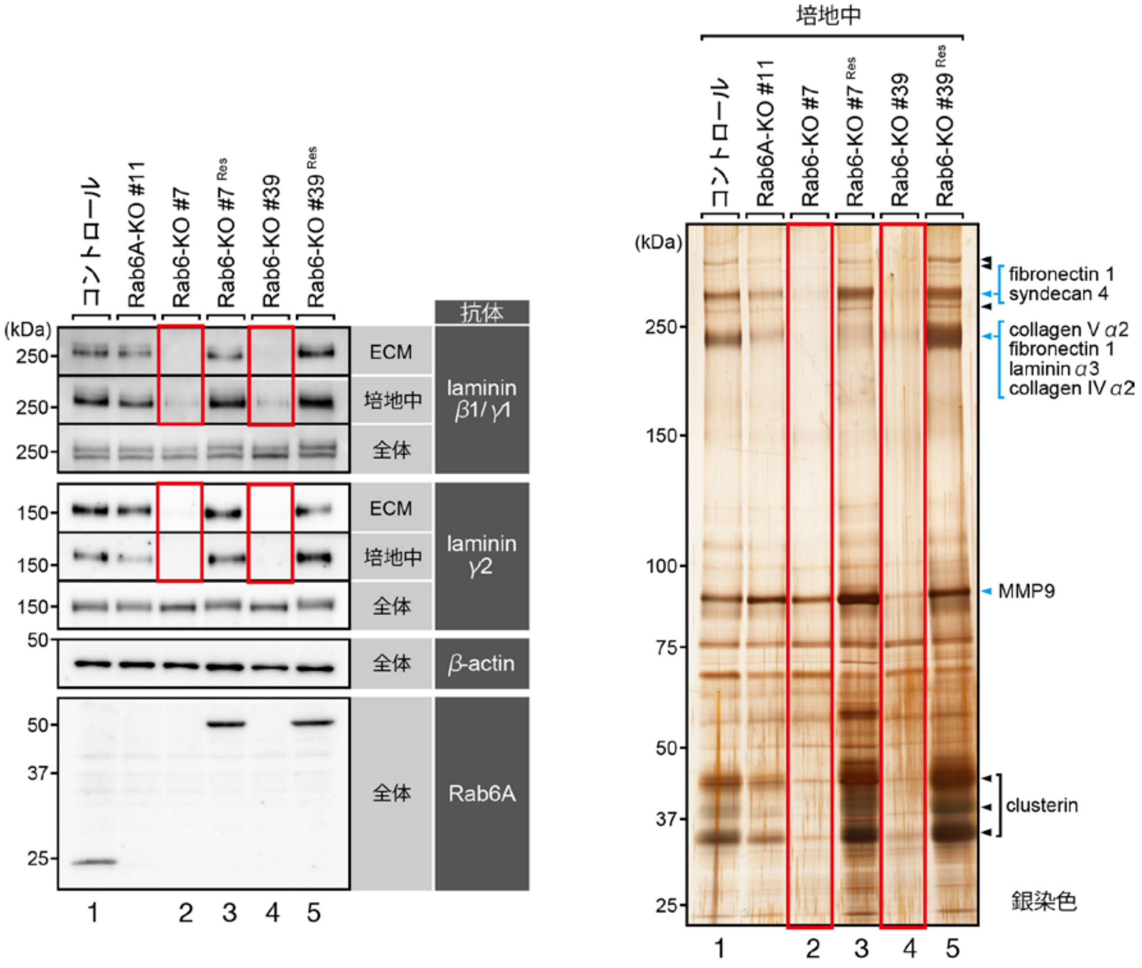

図３ Rab6-KO 細胞における基底膜成分を含む可溶性蛋白質全般の分泌阻害

（左）Rab6 の KO 細胞における基底膜成分の分泌阻害（レーン 2 及び 4 の赤枠）。コントロールの細胞では、基底膜の成分であるラミニン（laminin）が培地中や基底膜（ECM: extracellular matrix）に正しく分泌されていますが（レーン1）、Rab6 の KO 細胞ではラミニンは細胞外に分泌されず、細胞内に留まっていること（全体）が明らかになりました。

（右）Rab6 の KO 細胞における可溶性蛋白質全般の分泌の著しい低下（レーン 2 及び 4 の赤枠）。コントロールの細胞で培養液中に放出された可溶性蛋白質（一部膜蛋白質も含む）を銀染色により検出すると、多くの蛋白質のバンドが検出されます（レーン 1）。一方、Rab6 の KO 細胞では、コラーゲン、ラミニンなどの基底膜成分（水色の矢頭）を含む多くのバンドが消失あるいはその量が顕著に減少していました。

尚、これらの分泌異常は、緑色蛍光蛋白質（EGFP）を付加した Rab6 の再発現（Res: rescue）により完全に回復することが確認できました（レーン 3 及び 5）。

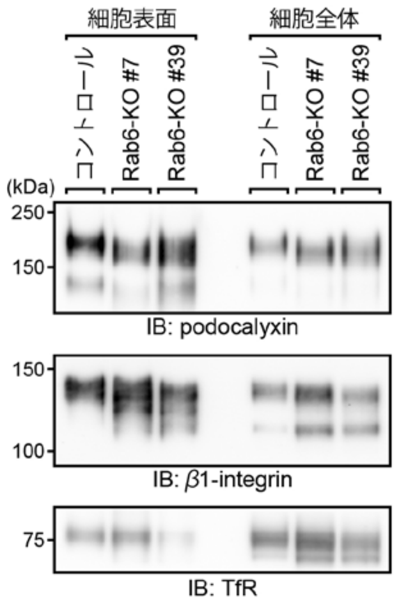

図４　Rab6-KO 細胞における膜蛋白質の細胞膜への適切な局在

コントロール細胞と Rab6 の KO 細胞の、細胞表面の蛋白質量を比較しました。その結果、ポドカリキシン（podocalyxin）、β１ インテグリン（integrin）、トランスフェリン受容体（TfR）の細胞表面の存在量には大きな変化は認められませんでした。（ただし、蛋白質の修飾状態には差が生じています。）

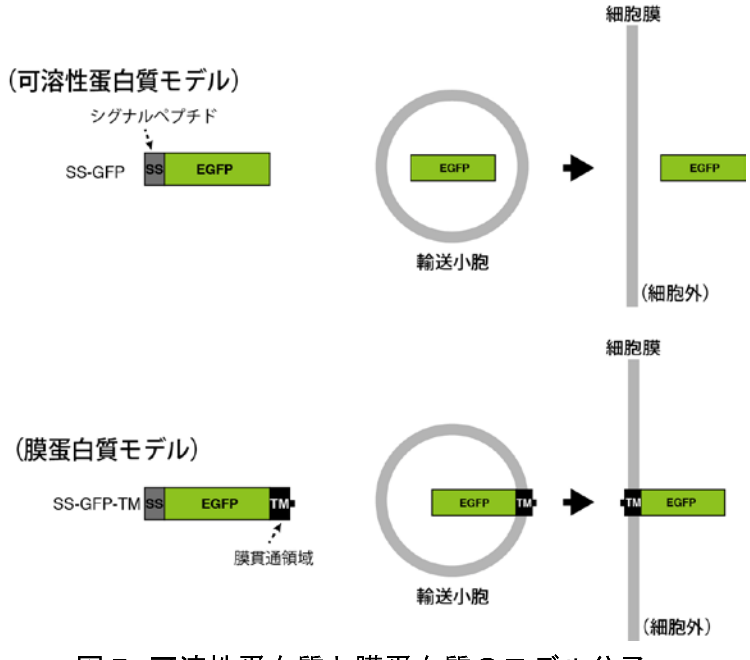

図５　可溶性蛋白質と膜蛋白質のモデル分子

（上段）緑色蛍光蛋白質（EGFP: enhanced green fluorescent protein）にシグナルペプチド（SS: signal sequence）を付加した可溶性蛋白質のモデル分子。SS-EGFP は輸送小胞の内部に含まれ、細胞膜に融合後は細胞外へと分泌されます。

（下段）SS-EGFP に膜貫通領域（TM: transmembrane domain）を付加した膜蛋白質のモデル分子。SS-EGFP-TM は膜貫通領域を持つため、融合後も細胞膜に残ります。

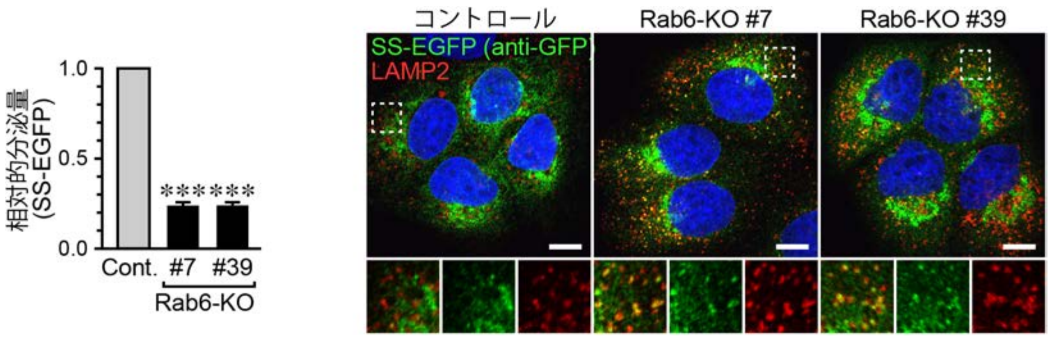

図６ Rab6-KO 細胞におけるモデル可溶性蛋白質の輸送阻害とリソソームでの分解

（左）コントロール細胞（Cont.）とRab6 の KO 細胞における SS-EGFP の培地中への相対的分泌量。

（右）Rab6 の KO 細胞では、細胞外に分泌されなかった SS-EGFP（緑色）はリソソーム（LAMP2：赤色）に内に局在して見えます（下段は、上段の四角の拡大図を示します）。一方、コントロールの細胞では、SS-EGFP はリソソームに局在しないため、赤と緑のシグナルが完全に分離して見えます（下段、左隅）。スケールバー＝10 μm。

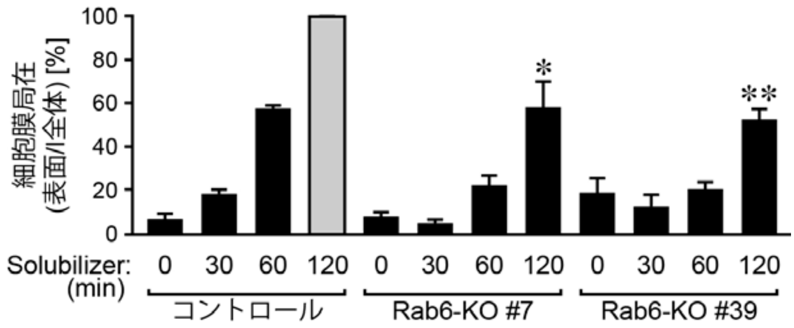

図７ Rab6-KO 細胞におけるモデル膜蛋白質の細胞膜への輸送

コントロール細胞と Rab6 の KO 細胞におけるモデル膜蛋白質（SS-EGFP-FM4-TM）の細胞膜への輸送。ここでは、図5の SS-EGFP-TM に FM4 と呼ばれる特殊なオリゴマー化ドメインを含んだ SS-EGFP-FM4-TM を用いて、同調的な輸送システム（Solubilizer と呼ばれる試薬の添加により輸送がスタート）を用いています。Rab6 の KO 細胞では、細胞膜への輸送は遅延しているものの、モデル膜蛋白質は細胞膜へと輸送されていることが明らかになりました。このため、定常状態では細胞膜の膜蛋白質の量には大きな影響は見られないと考えられます（図4）。

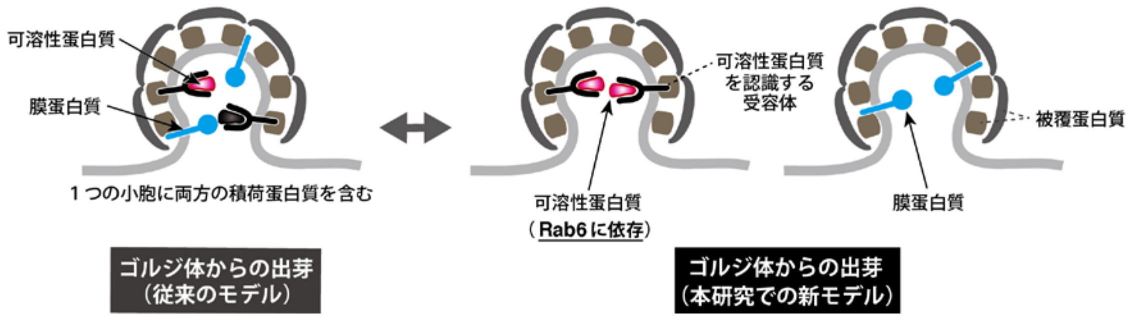

図８ ゴルジ体での積み荷分子の輸送小胞への積み込みモデル

(左)ゴルジ体からの輸送小胞の形成(出芽)における従来のモデル。従来のモデルでは、可溶性蛋白質と膜蛋白質は同じ輸送小胞に選別されると考えられています。

(右)ゴルジ体からの輸送小胞の形成(出芽)における新モデル。本研究により、可溶性蛋白質の細胞外への分泌は Rab6 に強く依存することが明らかになりました。Rab6 が無いと、可溶性蛋白質はリソソームへと運ばれ分解を受けます。一方、膜蛋白質の輸送は遅延するものの、Rab6 が無くとも細胞膜へと輸送されます。これらの結果は従来のモデルでは説明することができず、少なくとも Rab6 が無い状態では膜蛋白質は可溶性蛋白質とは別個に細胞膜へと輸送されると考えられます。

【用語説明】

＊１　分泌経路

細胞は細胞膜によって外界から隔てられており、細胞間の情報交換などを行うために、様々な蛋白質（例えば、後述*3 のコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分）を細胞外に分泌（放出）しています。このような分泌蛋白質はリボソームで合成された後、小胞体、ゴルジ体を経て、最終的に細胞膜まで到達し、細胞外へと分泌されています（図 1 参照）。小胞体、ゴルジ体、細胞膜の間の輸送は、分泌蛋白質を輸送小胞に包み込んだ形で行われており、この一連の流れは「分泌経路」と呼ばれています。2013 年には、分泌経路の基本的な仕組みの解明に対して、ノーベル生理学・医学賞が贈られています。

＊２　低分子量 G 蛋白質 Rab

細胞内の小胞や膜の輸送を適切に行うためには 交通整理人（制御蛋白質）の存在が不可欠です。この交通整理人の一つとして全ての真核生物に存在しているのが低分子量 G 蛋白質 Rab です。ヒトを含む哺乳類は 58 種類の Rab 遺伝子を共通して持っており、それぞれの Rab が固有の小胞輸送経路を制御する（例えば、本研究で明らかになった Rab6 は可溶性蛋白質の分泌経路に関与する）と考えられています。

＊３　細胞外マトリックス

　多細胞生物体で、細胞を取り巻くように存在する不溶性物質の総称で、細胞−基質接着における足場などの役割を担います。主要な成分としてコラーゲンやラミニンが挙げられます。

＊４　ゲノム編集技術（CRISPR/Cas9）

　部位特異的なヌクレアーゼ（核酸分解酵素、例えば Cas9）を用いて、標的遺伝子を改変する技術で、特に CRISPR/Cas9 が最も有望な技術として広く用いられています。

＊５　MDCK（Madin-Darby canine kidney）細胞

　イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株で、*in vitro* の培養で上皮細胞様の組織（細胞同士が密着結合により結合するため、機能的・物理的に隔てられた頂端膜と側底膜という 2 種類の細胞膜）を形成することから（図２、右下の模式図参照）、上皮細胞の研究に最も良く使用されています。

＊６　３次元シスト

　MDCK 細胞を細胞外マトリックス中で培養すると、内腔を有する球状構造（3 次元シスト）を形成し、側底膜側（シストの外側）に細胞からの分泌によって生じたコラーゲン、ラミニンなどを含む基底膜が見られます（図２参照）。

＊７　エクソソーム

　上述の*1 の分泌経路によって放出される分泌蛋白質とは異なり、直径 100 nm 程度の小胞の形で細胞外へと放出される細胞外小胞の一種です。エクソソームは内部に小胞を含んだ多胞体と呼ばれるオルガネラ（細胞小器官）が細胞膜と融合することにより放出されると考えられていますが、その詳細な分子機構は未だ解明されていません。エクソソームの内部には、様々な蛋白質や核酸が含まれており、新たな細胞間コミュニケーションの手段として近年注目を集めています。

【論文題目】

題目：Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells
著者：Yuta Homma, Riko Kinoshita, Yoshihiko Kuchitsu, Paulina S. Wawro, Soujiro Marubashi, Mai E. Oguchi, Morié Ishida, Naonobu Fujita & Mitsunori Fukuda
雑誌：***Journal of Cell Biology***

【問い合わせ先】
（研究に関すること）
東北大学大学院生命科学研究科
担当　福田　光則（ふくだ　みつのり）
電話番号：022-795-7731（or 022-795-3641）
E メール：mitsunori.fukuda.c1@tohoku.ac.jp

（報道に関すること）
東北大学大学院生命科学研究科広報室
担当　高橋　さやか（たかはし　さやか）
電話番号：022-217-6193
E メール：lifsci-pr@grp.tohoku.ac.jp