

福田独立主幹研究ユニット

Fukuda Initiative Research Unit

独立主幹研究員 福田 光 則
FUKUDA, Mitsunori

我々の体の構成単位である細胞はさらに様々な膜系いわゆる細胞内小器官により構成されているが、これらの膜系は決して独立した器官ではなく、小胞（膜）輸送を介して情報交換を行っている。適切な膜の交通（細胞内小胞輸送）は生命活動の維持に不可欠であることから、その制御メカニズムの解明は生物学・医科学における重要な課題の1つと考えられる。

当研究ユニットでは低分子量 G タンパク質 Rab27A の変異により発症するヒトの遺伝病 Griscelli 症候群に着目し、その症状を小胞輸送という観点から捉え（毛髪の部分白化 = メラニン色素胞輸送異常, 免疫疾患 = 細胞性傷害顆粒の放出異常, 神経疾患 = 受容体の輸送異常）, その発症メカニズムを分子レベルで解明することを目指している。具体的には当研究ユニットで同定・命名された Rab27A エフェクター・シナプトタグミン様タンパク質 (Slp) および Slac2 ファミリーがどのように Rab27A 分子の機能を制御するのかを明らかにし, Rab27A を介する小胞輸送の分子メカニズムの全貌を解明することを目指している。

1. Rab27 エフェクタードメイン (SHD) の同定とその機能解析 (福田, 菅野, 緒方, 佐藤, 黒田 *)

細胞内小胞輸送には細胞内で恒常的に行われている構成性小胞輸送と, 細胞外からの刺激により制御される調節性小胞輸送の2つに大別することができる。神経伝達物質の放出に代表されるように, 後者の調節性小胞輸送の多くはカルシウムイオンにより厳密に制御されており, この過程にはカルシウム結合タンパク質の関与が示唆されている。シナプトタグミンファミリーは細胞質側にカルシウム結合領域である C2 モチーフを2ヶ所タンデムに持ち (C2A, C2B ドメインと呼ばれる), これまで神経伝達物質放出や内分泌細胞からのホルモン分泌に重要な役割を果たすことが明らかにされている。我々は調節性小胞輸送に関わるシナプトタグミンおよびその関連分子の機能の全貌を明らかにするため, カルボキシル末端側にタンデム C2 ドメインを持つタンパク質 (C 型タンデム C2 タンパク質) の探索を行い, シナプトタグミンに類似した新規のタンパク質群を同定し, シナプトタグミン様タンパク質 (Synaptotagmin-like protein; Slp) と命名した。Slp はヒトおよびマウスにおいて5つの異なる遺伝子にコードされており (Slp1-5), いずれもアミノ末端側に2つの保存された α -ヘリックス領域 (Slp homology domain: SHD1 および SHD2) を持つことが明らかとなった。Slp2-5 では alternative splicing により多数の遺伝子産物が組織特異的に産生されており (例えば Slp2-a/b/c/d など), Slp ファミリーの機能の多様性が示唆される。Slp3-5 では SHD1 と SHD2 が zinc 結合配列により隔てられており (タイプ I 型 SHD), Slp1-2 では SHD1 と SHD2 が連結する

(タイプ II 型 SHD) という構造的特徴を有する。また SHD は C2 ドメインを持たない Slac2 (Slp homologue lacking C2 domains) と命名した一群のタンパク質 (Slac2-a/b/c) にも見いだされたことから, SHD は新規のタンパク質結合モチーフではないかと推定された。当研究ユニットでは相同性検索および詳細な生化学的解析により SHD には低分子量 G タンパク質 Rab27A および Rab27B が特異的に結合する (Rab27 に近縁の Rab3 を含め他の Rab には結合しない) こと, すなわち SHD は Rab27 のエフェクタードメインであることを世界に先駆けて初めて明らかにした。部位特異的変異体を用いた解析により SHD と Rab27 の結合は GTP 依存性であり, 活性化型の GTP-Rab27 は SHD1 に直接結合することも明らかとなった。さらに Griscelli 症候群患者に見られる Rab27A のミスセンス変異の解析により W73G などの変異によりエフェクターとの結合能が失われていることも明らかにすることができた。現在, なぜ60種類以上存在する Rab のうち Rab27 のみを特異的に認識することができるのか, SHD による Rab27 分子認識メカニズムを構造的に検討中である。

2. メラノソーム (メラニン色素胞) 輸送における Rab27 エフェクターの機能解析 (黒田 *, 伊藤, 福田)

メラノソーム (メラニン色素胞) の輸送はメラノサイト (メラニン色素産生細胞) で合成されたメラノソームがまず微小管に沿って細胞辺縁部へと輸送され, 次いでアクチン線維へと受け渡され, その後近傍のケラチノサイトへと受け渡されるという一連の複雑なプロセスにより成り立っている。Griscelli 症候群の患者ではメラノソーム産生には全く異常が認められず, アクチン線維上のメラノソーム輸送異常により, メラノソームが核周辺部に蓄積し, 結果的に毛髪の部分白化という症状を呈することが知られている。Griscelli 症候群の原因遺伝子としてはこれまで低分子量 G タンパク質をコードする *RAB27A* およびアクチン依存性モータータンパク質をコードする *MYO5A* が同定されているが, なぜこれらの2つの遺伝子の変異によりメラノソームの輸送異常が起こるのかといった分子メカニズムはこれまで全く明らかにされていなかった。当研究ユニットでは遺伝学的・組織学的・生化学的解析からメラノサイトには Rab27A エフェクターの1つ, Slac2-a (melanophilin と呼ばれる) が発現しており, Slac2-a がメラノソーム上の Rab27A とモータータンパク質であるミオシン Va を直接結合するリンカータンパク質 (“missing link”) であることを初めて明らかにした。Slac2-a の dominant negative 変異体を用いた解析から, Slac2-a はアミノ末端側の SHD を介して GTP-Rab27A を, 中央部分でミオシン Va を, またカルボキシル末端部分でアクチンを同時に結合し, 四者複合体

を形成すること、この四者複合体の形成が微小管からアクチン線維へのメラノソームの受け渡しに必須であることも明らかとなった。これらの結果により、Rab27A・Slac2-a・ミオシン Va 複合体のいずれかが 1 つが欠けてもメラノソームは正常に輸送できず、Griscelli 症候群様の症状を呈することが容易に理解できる。

我々はさらに Slac2-a の相同分子として Slac2-c (MyRIP と呼ばれる) を同定し、この分子が Slac2-a と同様に Rab27 とモータータンパク質ミオシン Va およびミオシン VIIa (Usher syndrome type IB の原因遺伝子産物: 視覚および聴覚異常を呈するヒト遺伝病) と相互作用することを見いだした。現在、Slac2-c がミオシン VIIa と結合して網膜メラノソームの輸送に関与するものと想定し、その可能性を検討中である。

3. 調節性小胞輸送 (分泌) における Rab27 エフェクターの機能解析 (三枝, 福田)

Griscelli 症候群患者の多くは上述の毛髪の部分白化に加え、細胞性傷害顆粒の放出異常による重篤な免疫疾患の症状を呈するが、Rab27 を介する顆粒放出の分子メカニズムはこれまで全く解明されていなかった。当研究ユニットでは Rab27A および Rab27B が内分泌細胞においても豊富に存在することに着目し、PC12 細胞の有芯顆粒からの開口放出をモデル系として Slp ファミリーの機能解析を試みた。その結果、PC12 細胞においては Slp4-a (granuphilin-a と呼ばれる) が内在性に発現しており、Rab27A の GDP 型に結合することによりカルシウム依存性の有芯顆粒開口放出を抑制することを見いだした。また Slp4-a とは逆にカルシウム依存的リン脂質結合能を有する Slp3-a および Slp5 は GTP-Rab27A に結合することによりカルシウム依存性の有芯顆粒開口放出を促進する作用を持つことも明らかとなった。さらにインスリンを分泌することで知られるすい臓の β 細胞には Slac2-c が発現しており、インスリン含有小胞をアクチン線維につなぎ止め、インスリン分泌を促進する効果があることも明らかとなった。今後、Rab27 とそのエフェクターによる調節性顆粒放出の制御メカニズムをノックアウトマウスなどの解析により明らかにするとともに、免疫系で機能する Slp/Slac2 分子を同定する予定である。

4. Rab27 調節因子 (GAP/GEF) の同定とその機能解析 (伊藤, 福田)

Rab27A は GTP と結合している活性化型、GDP と結合している不活性化型の 2 つのフォームをとり、活性化型が特定のエフェクター分子 (Slp および Slac2) と結合することで機能を発揮すると考えられている。当研究ユニットでは、最近 Griscelli 症候群患者の Rab27A に見られる点突然変異の解析を行い、GTP が結合できない (L130P) あるいは活性化型固定化 (A152P) が、発症の原因であることを突き止めた。すなわち、エフェクターとの結合のみならず活性化型、不活性化型のサイクリングも Rab27A の正常な機能には必須であり、我々の体内には Rab27A 活性化因子 (GEF: Guanine nucleotide exchange factor) および不活性化因子 (GAP: GTPase-activating protein) が存在するはずであるが、その実体は全く明らかにされていない。そこで本研究では Rab27A に対する活性化因子、不活性化因子を

生化学的手法により同定し、Rab27A を介する膜輸送系を時空間的に制御する情報伝達機構の解明を目指している。

5. シナプトタグミンファミリーによる調節性小胞輸送の制御機構解析 (福田, 菅野, 緒方, 佐藤)

シナプトタグミンは上述の Slp と同様カルボキシル末端側に C2 ドメインをタンデムに持つが、アミノ末端側には SHD の代わりに膜貫通領域を 1 ケ所持つ小胞上の膜タンパク質である。シナプトタグミンは線虫から哺乳動物に至るまで進化的に保存されたタンパク質ファミリーで、我々はこれまでにヒトおよびマウスにおいて 15 種類のシナプトタグミン (I-XV) を同定している。当研究ユニットではこれまでシナプス小胞上に豊富に存在するシナプトタグミン I に着目し、この分子が C2 ドメインを介してシナプス小胞のプレシナプス膜への結合 (ドッキングの過程)、シナプス小胞とプレシナプス膜との融合の過程 (“カルシウムセンサー” として機能)、さらには小胞のリサイクリングの過程に必須の多機能分子であることを明らかにしている。またシナプトタグミンの幾つかのアイソフォーム (I, VI, IX など) に関してはカルシウムイオンにより調節される他の小胞輸送過程 (例えば神経突起伸長時の成長円錐小胞の輸送、内分泌細胞の有芯顆粒からのホルモン分泌、細胞膜の修復、精子先体反応など) に関与することも既に明らかにしている。特に PC12 細胞においては 3 種類のシナプトタグミンアイソフォームが有芯顆粒上に発現し (I, IV, IX)、シナプトタグミン I および IX に関しては有芯顆粒の開口放出制御に redundant な機能を発揮することを明らかにすることができた。またシナプトタグミン IV は通常ゴルジ体に存在し、神経成長因子 (NGF) などの刺激により有芯顆粒上へと移行し有芯顆粒の開口放出制御に関わることから、神経細胞においては神経活動依存的に起こるシナプス部の質的・量的変動に重要な役割を担うものと推測される。今後、脳内分布、細胞内局在および機能が未同定のアイソフォームに関しても RNA 干渉法などの手法を用いて細胞レベルでノックダウンすることにより、それらの機能を明らかにしていく予定である。

* ジュニア・リサーチ・アソシエイト

The Rab protein family, one of the small GTP-binding protein superfamilies, is believed to be essential for intracellular membrane trafficking in eukaryotic cells. In our research unit, we focus on the *RAB27A* gene, in which mutations cause haemophagocytic syndrome (Griscelli syndrome), an uncontrolled T lymphocyte and macrophage activation syndrome in humans and try to understand the molecular mechanism of Rab27A-dependent membrane trafficking. We recently discovered that Slp homology domain (SHD) of the synaptotagmin-like protein (Slp) family and Slac2 directly interacts with the GTP-bound activated form of Rab27A. We are now investigating the involvement of the Slp and Slac2 families in Rab27A-dependent membrane trafficking, such as granule exocytosis in cytotoxic T lymphocytes and melanosome transport in melanocytes.

1. Identification and characterization of SHD as

a novel Rab27 effector domain

The synaptotagmin-like protein (Slp) family (Slp1-5) has recently identified as a new group of C-terminal-type (C-type) tandem C2 proteins that contain two C2 Ca^{2+} -binding motifs (named the C2A domain and the C2B domain) and a unique N-terminal Slp homology domain (SHD). The SHD usually consists of two conserved α -helical regions (SHD1 and SHD2) separated by two zinc-finger motifs (type I SHD), but the SHDs of Slp1 and Slp2-a lack zinc-finger motifs, and the two SHDs are linked together (type II SHD). To date, a total of five distinct *slp* genes (*slp1-5*) have been reported in humans and mice, and some of them have several alternatively spliced isoforms (e.g., Slp2-a/b/c/d). Since the SHD is also found in other proteins (named Slac2; Slp homologue lacking C2 domains), we previously suggested that the SHD might serve as a novel protein motif. We recently discovered that the SHD specifically and directly binds the GTP-bound form of Rab27A and Rab27B and proposed that the SHD functions as a novel Rab27 effector domain.

2. Role of the Slp and Slac2 families in melanosome transport in melanocytes

Although mutations in either the *RAB27A* gene or the *MYO5A* gene are known to cause human Griscelli syndrome, which is characterized by defects in melanosome transport in melanocytes (i.e., clumping of melanosomes in the perinuclear region), functional relationships between Rab27A and myosin Va, an actin-based motor protein, in melanosome transport remained to be clarified. We recently discovered that Slac2-a (also called melanophilin), one of the Rab27 effectors that we have identified, functions as a “missing link” between Rab27A on melanosomes and myosin Va and that formation of a tripartite protein complex (Rab27A•Slac2-a•myosin Va) is essential for actin-based melanosome transport. We also identified Slac2-c (also called MyRIP), a homologue of Slac2-a. Slac2-c is also capable of interacting with Rab27A/B and myosin Va/VIIa. Since mutations in the *MYO7A* gene cause auditory and retinal defects in humans (Usher syndrome type IB), Slac2-c might be involved in retinal melanosome transport by analogy to the function of Slac2-a in melanocytes.

3. Role of the Slp and Slac2 families in regulated secretion

In addition to the melanosome transport, Rab27A (or Rab27B) is also involved in the control of regulated granule exocytosis in some immune cells and endocrine cells possibly through interaction with different Rab27 effectors. By using endocrine PC12 cells, we found that Slp4-a (also called granuphilin) is a negative regulator for dense-core vesicle exocytosis through interaction with GDP-bound form of Rab27A, whereas Slp3-a and Slp5, Ca^{2+} -dependent type Slps, promote Ca^{2+} -dependent dense-core vesicle exocytosis through interaction with GTP-bound form of Rab27A. We also found that Slac2-c is involved in insulin secretion from pancreatic β -cells through interaction with actin. We are now trying to identify Rab27 effector(s) that functions in immune cells.

4. Identification and characterization of specific GAP/GEF for Rab27

Since constitutive active mutants of Rab27A (mimics GTP-bound form) in Griscelli syndrome patients do not support normal melanosome transport in melanocytes, the appropriate GDP/GTP exchange cycle of Rab27A is essential for this process. Although the GDP/GTP exchange cy-

cle of small G proteins is generally believed to be controlled by two regulatory proteins, GEF (Guanine nucleotide exchange factor) and GAP (GTPase-activating protein). However, no such GEF or GAP specific for Rab27A has ever been elucidated. We are now biochemically isolating RAB27-GEF and -GAP proteins to understand the molecular mechanism of the activation/inactivation of Rab27A during melanosome transport.

5. Role of the synaptotagmin family in Ca^{2+} -regulated exocytosis

Synaptotagmin (Syt) represents a large family of putative membrane trafficking proteins conserved from nematoda to humans, and it is defined as a C-type tandem C2 protein with an N-terminal single transmembrane domain. To date, 15 distinct syt genes (*syt I-XV*) have been identified in mice and humans. Syt I is the best characterized isoform of Syt abundant on synaptic vesicles, and we have previously shown that Syt I is essential for synaptic vesicle exocytosis (possibly functioning as a Ca^{2+} -sensor) and endocytosis in neurons. We recently found that several Syt isoforms (e.g., Syts I, VI, and IX) are also involved in other types of Ca^{2+} -regulated membrane trafficking, such as dense-core vesicle exocytosis in some endocrine cells, growth cone vesicle exocytosis during neurite outgrowth, plasma membrane repair, and acrosome reaction. We are now investigating the functions and subcellular localization of other Syt isoforms.

Research Subjects and Members of Fukuda Initiative Research Unit

1. Identification and characterization of SHD as a novel Rab27 effector domain
2. Role of the Slp and Slac2 families in melanosome transport in melanocytes
3. Role of the Slp and Slac2 families in regulated secretion
4. Identification and characterization of specific GAP/GEF for Rab27
5. Role of the synaptotagmin family in Ca^{2+} -regulated exocytosis

Head

Dr. Mitsunori FUKUDA

Members

Dr. Takashi ITOH

Technical Staff

Ms. Eiko KANNO

Ms. Yukie OGATA

Ms. Chika SAEGUSA

Ms. Megumi SATOH

Visiting Members

Mr. Taruho S. KURODA (Grad. Sch. Pharm. Sci., Hokkaido Univ.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文

- Fukuda M.: "Molecular cloning and characterization of human, rat, and mouse synaptotagmin XV", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 64–71 (2003). *
- Fukuda M.: "Molecular cloning, expression, and characterization of a novel class of synaptotagmin (Syt XIV) conserved from *Drosophila* to humans", *J. Biochem.* **133**, 641–649 (2003). *
- Fukuda M., Kanno E., Ogata Y., Saegusa C., Kim T., Peng L. Y., and Yamamoto A.: "Nerve growth factor-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells", *J. Biol. Chem.* **278**, 3220–3226 (2003). *
- Bahadoran P., Busca R., Chiaverini C., Westbroek W., Lambert J., Bille K., Valony G., Fukuda M., Naeyaert J., Ortonne J., and Ballotti R.: "Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by *RAB27A* missense mutations found in patients with Griscelli syndrome", *J. Biol. Chem.* **278**, 11386–11392 (2003). *
- Fukuda M.: "Distinct Rab binding specificity of Rim1, Rim2, rabphilin, and Noc2: Identification of a critical determinant of Rab3A/Rab27A recognition by Rim2", *J. Biol. Chem.* **278**, 15373–15380 (2003). *
- Fukuda M.: "Slp4-a/granuphilin-a inhibits dense-core vesicle exocytosis through interaction with the GDP-bound form of Rab27A in PC12 cells", *J. Biol. Chem.* **278**, 15390–15396 (2003). *
- Haberman Y., Grimberg E., Fukuda M., and Sagi-Eisenberg R.: "Synaptotagmin IX, a possible linker between the perinuclear endocytic recycling compartment and the microtubules", *J. Cell Sci.* **116**, 4307–4318 (2003). *
- Yoo S., Nguyen M. P., Fukuda M., Bittner G. D., and Fishman H. M.: "Plasmalemmal sealing of transected mammalian neurites is a gradual process mediated by Ca^{2+} -regulated proteins", *J. Neurosci. Res.* **74**, 541–551 (2003). *
- Sato M., Moroi K., Nishiyama M., Zhou J., Usui H., Kasuya Y., Fukuda M., Kohara Y., Komuro I., and Kimura S.: "Characterization of a novel *C. elegans* RGS protein with a C2 domain: evidence for direct association between C2 domain and Gαq subunit", *Life Sci.* **73**, 917–932 (2003). *
- Waselle L., Coppola T., Fukuda M., Iezzi M., El-Amraoui A., Petit C., and Regazzi R.: "Involvement of the Rab27 binding protein Slac2c/MyRIP in insulin exocytosis", *Mol. Biol. Cell* **14**, 4103–4113 (2003). *
- Kuroda T. S., Ariga H., and Fukuda M.: "The actin-

binding domain of Slac2-a/melanophilin is required for melanosome distribution in melanocytes", *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5245–5255 (2003). *

Sadakata T., Mizoguchi A., Sato Y., Katoh-Semba R., Fukuda M., Mikoshiba K., and Furuichi T.: "The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotransmitter release and cell survival", *J. Neurosci.* **24**, 43–52 (2004). *

(総 説)

Fukuda M.: "Synaptotagmins, Ca^{2+} - and phospholipid-binding proteins that control Ca^{2+} -regulated membrane trafficking", *Recent Res. Dev. Chem. Phys. Lipids* **1**, 15–51 (2003).

黒田垂歩, 福田光則: "リソソーム関連疾患と低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab : Rab27A とミオシン Va の運命的出会い", *実験医学* **21**, 2039–2047 (2003).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Fukuda M.: "Role of the synaptotagmin family proteins in Ca^{2+} -regulated membrane trafficking", *Int. Symp. on New Horizons of Biomedicine*, (Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Korean Academy of Science and Technology, and others), Seoul, Korea, Oct. (2003).

Zhang Q., Pascual O., Perea G., Araque A., Fukuda M., and Haydon P. G.: "Expression of synaptotagmin IV, V and XI in CA1 area hippocampal astrocytes", *33rd Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2003)*, New Orleans, USA, Nov. (2003).

Sadakata T., Sato Y., Katoh-Semba R., Mizoguchi A., Fukuda M., Mikoshiba K., and Furuichi T.: "The secretory granule associated protein CERAIRN regulates neurotransmitter release and cell survival", *33rd Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2003)*, New Orleans, USA, Nov. (2003).

Sadakata T., Sato Y., Katoh-Semba R., Mizoguchi A., Fukuda M., Mikoshiba K., and Furuichi T.: "The secretory granule associated protein CAPS2 regulates neurotransmitter release and cell survival", *1st COE Int. Symp. Gunma Univ.: Molecular Mechanisms of Vesicle Trafficking and Membrane Fusion*, Maebashi, Nov. (2003).

(国内会議)

定方哲史, 佐藤友美, 仙波りつ子, 溝口明, 福田光則, 御子柴克彦, 古市貞一: "新規分子 CERAIRN による小脳顆粒細胞からの神経栄養因子の分", *第 26 回日本神経科学大会*, 名古屋, 7 月 (2003).

福田光則: "シナプトタグミンファミリーによるカルシウム依存性開口放出の制御機構", *第 26 回日本神経科学大会*, 名古屋, 7 月 (2003).

皆川徹也, 福田光則, 御子柴克彦: "Distinct phosphoinositide binding specificity of the GAP1 family proteins: Characterization of the pleckstrin homology domains of MRASAL and KIAA0538", *第 76 回日本生化学会大会*, 横浜, 10 月 (2003).

黒田垂歩, 有賀寛芳, 福田光則: “Identification and characterization of novel Rab27 binding proteins (Slp and Slac2): Regulation of melanosome transport by the complex of Slac2-a, Rab27A, myosin Va, and actin”, 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2003).

福田光則: “Slp and Slac2, novel Rab27 effectors that control regulated exocytosis of secretory granules”, 第 76 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2003).

福田光則: “Rab27 エフェクター (Slp/Slac2) による調節性小胞輸送の制御メカニズム”, 第 26 回日本分子生物学会

年会, 神戸, 12 月 (2003).

上田こずえ, 岸田昭世, 大下彰彦, 福田光則, 御子柴克彦, 菊池章: “Wnt シグナル伝達分子 Dvl とシナプトタグミンの相互作用”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).

廣中克典, 福田光則, 喜多村直実, 御子柴克彦: “脳特異的シナプトタグミン (Srg1) の相互作用分子の同定とその生理的意義の解析”, 第 26 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2003).