

領域融合レビュー, 2, e006 (2013)
DOI: 10.7875/leading.author.2.e006
2013年5月29日 公開

メンブレントラフィックにおける普遍的な制御因子 Rab タンパク質 Rab GTPases and their roles in membrane traffic

大林典彦・福田光則
Norihiro Ohbayashi & Mitsunori Fukuda

東北大学大学院生命科学研究科 膜輸送機構解析分野

要約

真核生物の細胞に存在するエンドソームやリソソームなどのオルガネラや細胞膜は、それぞれが独立しているわけではなく、メンブレントラフィックにより密接にかかわりあっている。Ras スーパーファミリーに属する Rab タンパク質は、このメンブレントラフィックにおいてきわめて重要な制御因子である。Rab タンパク質の機能の異常は神経疾患や免疫疾患をはじめ、じつに多岐にわたる病態にかかわっていることから、Rab タンパク質は個々の細胞の生存だけでなく、さまざまな高次機能にも不可欠であると考えられている。ここでは、Rab タンパク質による制御機構やその生理機能、そして、Rab タンパク質の機能異常とそれにとまら病態に関する最近の知見を概説する。

はじめに

小胞体において合成され正しくフォールディングされた膜タンパク質や分泌タンパク質は、ゴルジ体およびトランスゴルジネットワークをへてさまざまな目的地へと運ばれる。たとえば、分泌経路により細胞の外や細胞膜へと輸送されるタンパク質や、エンドソームなどのオルガネラに輸送されるタンパク質がある。後者の輸送は、細胞膜からエンドサイトーシスによりオルガネラに到達するものとあいまって複雑なネットワークを構築しており、それぞれのオルガネラが膜やその内容物を交換しあっている。これらのネットワークは基本的に脂質二重膜に包まれた小胞の行き来により制御されており、供与側のオルガネラにおける積み荷タンパク質の選別と小胞の出芽、モータータンパク質による輸送、標的となる膜への繫留および融合といったダイナミックな膜動態をとまら。これらの膜動態を総称してメンブレントラフィック（膜輸送あるいは小胞輸送）とよんでいる（図 1）。また最近では、経済用語を

借用して細胞内ロジスティクスともよばれる。

近年、このメンブレントラフィックにおける普遍的な制御因子として注目をあつめているのが Rab タンパク質である。Rab ファミリーは Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質のなかで最大のファミリーを形成する。ヒトでは 66 種類の Rab タンパク質（GTPase ドメイン以外のドメインをもつ、ほかとはやや異なる Rab44 や Rab45 も含む）が報告されており、それぞれが特異的なメンブレントラフィックを制御するものと考えられている。Rab タンパク質は、ほかの低分子量 G タンパク質と同じく、2つのヌクレオチド結合状態をサイクルする分子スイッチとして機能する。すなわち、GTP 結合型の活性化状態と GDP 結合型の不活性化状態とのあいだでそのコンフォメーションを変換する。Rab タンパク質は膜に可逆的に結合するが、これは Rab タンパク質の活性化の状態に依存しており、一般的に、GTP 結合型である活性化型の Rab タンパク質は、C 末端に存在する 1 つまたは 2 つのシステイン残基を介してグラニルグラニル（疎水性プレニル基）化されることにより膜に結合している。膜に結合した活性化型 Rab タンパク質は、おのおの Rab タンパク質に特異的なエフェクタータンパク質と結合し、オルガネラにおける小胞の出芽、小胞の細胞骨格にそった輸送、あるいは、特異的なオルガネラへの繫留や融合を制御している²⁾。

ここでは、これら多彩な役割を担う Rab タンパク質の制御機構や生理機能、そして、Rab タンパク質の機能破綻による病態の発症機構について概説する。

1. 分子スイッチとしての Rab タンパク質によるオンオフの制御

細胞質において合成された Rab タンパク質は、そのままでは膜に結合することはできない。新規に合成された Rab タンパク質は、まず、Rab エスコートタンパク質

(REP : Rab escort protein) の作用により, Rab グラニルグラニル転移酵素 (Rab-GGT : Rab geranylgeranyl transferase) に受け渡される³⁾. つぎに, Rab-GGT は Rab タンパク質の C 末端に存在するシステイン残基をグラニルグラニル化する⁴⁾. この脂質化修飾により, Rab タンパク質は細胞膜やオルガネラ膜と相互作用することが可能になる. つづいて, Rab タンパク質に特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF : guanine-nucleotide exchange factor) の作用により GDP から GTP への交換反応 (活性化) が行われる⁵⁾. Rab タンパク質に GTP が結合すると Rab タンパク質のスイッチ I およびスイッチ II とよばれる領域において構造変化が起こり, スイッチ領域やスイッチ間領域にエフェクタータンパク質が結合することのできる活性化状態になる⁶⁾. 活性化型の Rab タンパク質と結合したエフェクタータンパク質は, その機能に応じてメンブレントラフィックにおけるさまざまなス

テップを制御する. これまでに報告されたエフェクタータンパク質は多種多様であり, のちに, いくつかの例を述べる.

さて, 膜に結合した活性化型の Rab タンパク質は, メンブレントラフィックにおける役割をおえると不活性化される必要がある. Rab タンパク質それ自体にも GTP を GDP に加水分解する GTPase 活性が備わっているが, この作用だけでは不十分で, Rab タンパク質に特異的な GTPase 活性化タンパク質 (GAP : GTPase-activating protein) の助けを得ることで Rab タンパク質は不活性化される⁷⁾. 不活性化された GDP 結合型の Rab タンパク質は, サイトゾルに存在する GDP 解離抑制因子 (GDI : GDP dissociation inhibitor) の作用により, C 末端のグラニルグラニル基を保持したまま膜から引き抜かれる. グラニルグラニル基は親水性であるサイトゾルでは不安定であるが, GDI がグラニルグラニル基に対しシャペロンとして

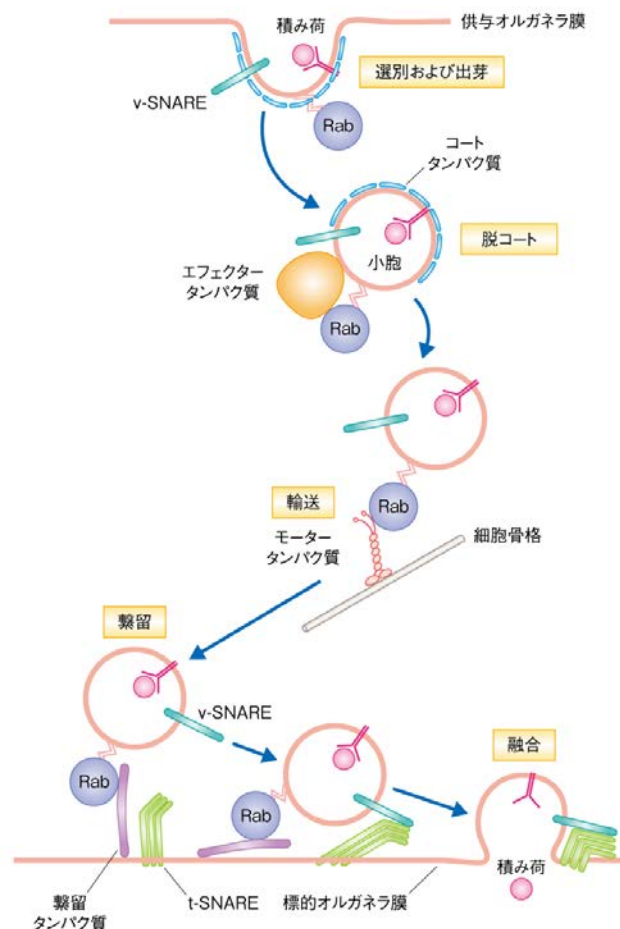


図1 メンブレントラフィックの概略

メンブレントラフィックは, まず, 供与側のオルガネラ膜の一部が“出芽”し, 膜がクラスリンなどによりコートされるとともに, その根元がくびりとられることにより輸送小胞が形成される. その際, 小胞に移行する膜の成分や内腔の成分の“選別”が行われる. つぎに, コートタンパク質は輸送小胞から解離し (“脱コート”), 細胞骨格にそって“輸送”され, 標的となるオルガネラに到達する. そののち, 標的となる膜へと“繫留”し“融合”することにより, 輸送小胞の積み荷は標的のオルガネラへと受け渡される. 選別および出芽, 脱コート, 輸送, 繫留, 融合の各ステップにおける Rab タンパク質およびそのエフェクタータンパク質 (モータータンパク質, 繫留タンパク質など) の機能を示す. また, 融合の過程においては, 輸送小胞に含まれる v-SNARE (vesicle-SNARE) と標的となる膜に存在する t-SNARE (target-SNARE) とが SNARE 複合体を形成し, 融合を促進する.

機能することにより不活性化型 Rab タンパク質をサイトゾルにおいて安定に保持し、再活性化されるまで待機させることができる⁸⁾。興味深いことに、REP と GDI はどちらも不活性化型 Rab タンパク質のシャペロンとしての機能をもつが、脂質化修飾された Rab タンパク質に対する親和性という点において両者は大きく異なる。REP はゲラニルゲラニル化 Rab タンパク質と未修飾 Rab タンパク質とに対する親和性において大きな差はないが、GDI はゲラニルゲラニル化 Rab タンパク質に対して圧倒的に高い親和性を持ち、Rab タンパク質の再利用における GDI の重要性の根拠となっている⁹⁾。不活性化型の Rab タンパク質は最終的に GDI から解離することによりふたたび膜と相互作用することが可能になり、GEF の作用により GTP 結合型の活性化状態へと変換する。なお、この GDI からの解離については、GDI 置換因子 (GDF : GDI displacement factor) により行われるとの報告もあるが¹⁰⁾、その機能は一部の Rab タンパク質に対してのみでありコンセンサスは得られていない。

このように、Rab タンパク質の活性化のスイッチ、および、それにとまなうオルガネラ膜への局在のオンオフのサイクルは、GEF, GAP, GGT, REP, GDI といったタンパク質の協調作用による制御を受けている (図 2)。

2. Rab タンパク質の細胞内局在とメンブレントラフィック

小胞体において新規に合成されたタンパク質は、ゴルジ体を経由してトランスゴルジネットワークに到達するとそこで選別を受け、さまざまな輸送の過程をへることになる。たとえば、ホルモン顆粒の産生やグルコース輸送体の輸送などには細胞膜への分泌経路が利用されており、この輸送経路では Rab3, Rab27, Rab10 などが活躍する^{11,12)}。細胞膜や初期エンドソームには Rab5 が存在し、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれた小胞と初期エンドソームとの融合を促す¹³⁾。また、初期エンドソームはソーティングエンドソームともよばれ、細胞膜や細胞の外から取り込まれた物質をさまざまなオルガネラへと振り分ける機能を持ち、Rab5 だけでなく、Rab4 や Rab21 をはじめ^{14,15)}、多くの Rab タンパク質が存在する。細胞に取り込まれた物質のうち不要なものは、初期エンドソームから分化した後期エンドソームをへてリソソームと融合することにより分解される。後期エンドソームからリソソームにかけては Rab7 が重要な機能を担う¹⁶⁾。一方、再利用すべき物質は、初期エンドソームから即座に細胞膜へともどる過程 (rapid recycling) と、いちど中心体の近傍に存在するエンドサイトーシスリサイクルコンパートメント (ERC : endocytic recycling compartment) へと運ばれそこから出芽したりサイクリングエンドソームにより細胞膜へともどる過程 (slow recycling) の、いずれかを經由する。前者の過程には Rab4 が¹⁴⁾、後者の過程には

Rab11 が主要なはたらきをしており、細胞接着因子であるインテグリンやカドヘリンのリサイクリングには Rab11 が積極的にかかわっている^{17,18)}。また、トランスフェリン受容体や一部のアミノ酸輸送体などリサイクリングエンドソームに移行したものは分解をうけないと考えられていたが、最近、Rab12 に依存的にリソソームにリクルートされるという新規の輸送過程も見い出されている^{19,20)}。さらに、初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームからは、トランスゴルジネットワークにも小胞を逆行輸送させており、その詳細はのちに述べる。

3. Rab タンパク質のオルガネラ膜への局在の特異性

Rab ファミリーを構成するそれぞれのメンバーは特異的な膜への局在を示し、固有のメンブレントラフィックを制御していると考えられている (図 3)。たとえば、Rab1

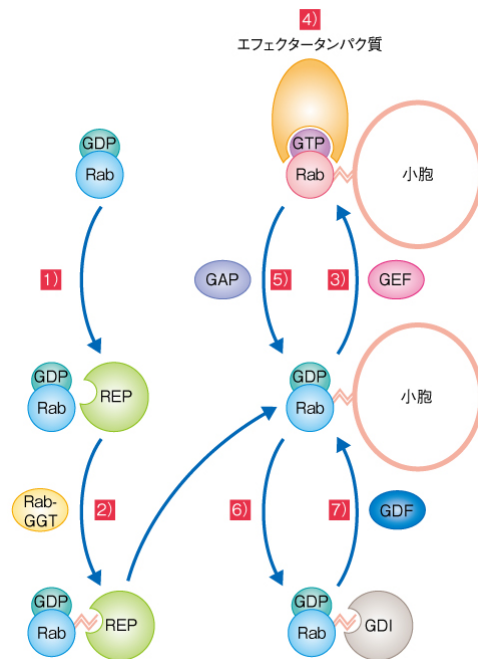


図 2 スイッチタンパク質 Rab による小胞輸送の制御機構

Rab タンパク質は、GTP と結合した活性化型と、GDP と結合した不活性化型とのあいだをサイクルする分子スイッチとして機能する。Rab タンパク質の活性化と不活性化は、それぞれ、GEF と GAP により制御される。1) 新規に合成された Rab タンパク質はまず REP と結合し、2) Rab-GGT と相互作用することにより脂質化修飾 (ゲラニルゲラニル化) され、3) GEF の作用により活性化されオルガネラ膜に結合する。4) 活性化型の Rab タンパク質はエフェクタータンパク質をオルガネラ膜にリクルートすることによりメンブレントラフィックを促進する。つぎに、5) 活性化型の Rab タンパク質は GAP により不活性化される。6) 不活性化型の Rab タンパク質は GDI の機能によりオルガネラ膜から引き抜かれるが、7) GDF や GEF の作用により活性化され、ふたたびオルガネラ膜へともどる。

やRab2は小胞体およびゴルジ体に局在して小胞体とゴルジ体とのあいだのメンブレントラフィックを制御し²¹⁾, Rab3は分泌小胞に特異的に局在してシナプス小胞などのエキソサイトーシスを制御している¹¹⁾. では, これら Rab タンパク質の膜への局在はどのように制御されているのだろうか. これまで, 以下に述べるような複数のモデルが提示されており, おそらく, それぞれのモデルを複合的に用いることにより Rab タンパク質の局在は規定されているものと思われる. Rab タンパク質の1次構造を比べてみると, Rab ファミリーのあいだでは保存されているが, Ras や Rho などほかの低分子量 G タンパク質には存在しない特異的な約5アミノ酸残基からなる配列が5か所に存在し F1~F5 とよばれている. さらに, SF1~SF4 とよばれる Rab サブファミリーのあいだでよく保存された比較的長いアミノ酸配列も4か所に存在している. これら F1~F5 および SF1~SF4 のアミノ酸配列が Rab タンパク質の局在性を規定するとのモデルが提示されている²²⁾.

そのほかにも, GEF が局所的に Rab タンパク質を GTP 型に変換して活性化し, GDI との親和性を低下させることによりその解離を促して, Rab タンパク質を特異的な膜と結合させるとのモデルが提唱されている. たとえば, Rab27A の GEF として知られる DENN/MADD は Rab27A のメラノソームへの局在を制御しているとの報告や²³⁾, Rab5 の GEF である Rabex-5 をミトコンドリアに異所的に発現させると本来は初期エンドソームに局在すべき Rab5 がミトコンドリアに局在するようになるとの報告は²⁴⁾, このモデルの裏づけになっている. このように, GEF は Rab タンパク質の局在制御における主要なタンパク質のひとつと考えられるが, そのためには, Rab タンパク質よりも対応する GEF がさきに特異的な膜に局在する必要性があり, それには, オルガネラ膜に存在するイノシトールリン脂質に対する GEF の親和性や, のちに述べる Rab カスケードのような分子機構が必要になる.

さらに, 活性化型の Rab タンパク質が特異的なオルガ

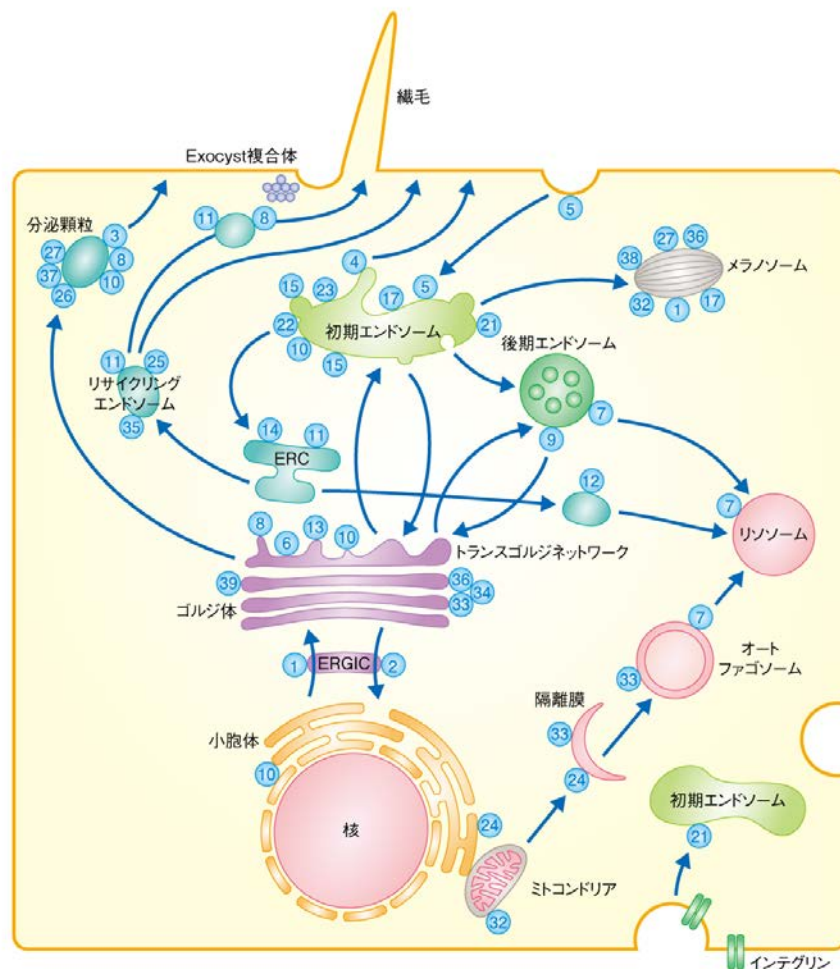


図3 細胞における Rab タンパク質の局在と機能

細胞における複雑なオルガネラネットワークのほとんどすべての局面において, Rab タンパク質は重要な役割を担っている. これらのうち, 代表的な過程についてはふれたが, そのほかのものについては文献を参考にされたい²⁾.

青色の数字は, Rab タンパク質のアイソフォームの番号を表す. ERC: endocytic recycling compartment, エンドサイトーシスリサイクルコンパートメント. ERGIC: ER-Golgi intermediate compartment, 小胞体-ゴルジ体中間区画.

ネラ膜に局在すると、ひきつづきそのエフェクタータンパク質が結合することにより、Rab タンパク質を膜において安定化させているとの報告もある。たとえば、後期エンドソームに局在する Rab9 はエフェクタータンパク質である TIP47 との結合がその局在に重要である²⁵⁾。また、初期エンドソームに局在する Rab5 はそのエフェクタータンパク質 Rabaptin-5 との結合を介し間接的に Rabex-5 を Rab5 自体にリクルートする。Rabex-5 は Rab5 の GEF として機能するためさらに Rab5 が活性化されることになり、Rab5 の局在がより安定化される²⁶⁾。すなわち、エフェクタータンパク質との結合は Rab タンパク質の局在にとり正のフィードバック的な要素を含むと考えることができる。

4. Rab タンパク質により輸送される積み荷タンパク質の選別と小胞の出芽

オルガネラのあいだを行き来する小胞は、その表面が COPII や COPII, あるいは、クラスリンなどのコートタンパク質によりおおわれている。これらのコートタンパク質はおもに Arf/Sar ファミリーに属する低分子量 G タンパク質により制御されながら供与側のオルガネラ膜に集積するが、輸送されるべき積み荷タンパク質の選別の過程には Rab タンパク質も重要な役割をはたしている。リソソームに含まれる酸性加水分解酵素は膜タンパク質であるマンノース 6-リン酸受容体に結合してトランスゴルジネットワークから後期エンドソームへと輸送されるが、後期エンドソームに到達した酸性加水分解酵素はマンノース 6-リン酸受容体から解離し、役目を果たしたマンノース 6-リン酸受容体はふたたびトランスゴルジネットワークへともどり再利用される。Rab9 のエフェクタータンパク質である TIP47 はマンノース 6-リン酸受容体の細胞質領域との結合能ももち、後期エンドソームに存在する Rab9 に TIP47 が結合すると TIP47 とマンノース 6-リン酸受容体との結合が強まり、後期エンドソームにおけるマンノース 6-リン酸受容体の輸送小胞への選別と出芽が促進される²⁷⁾。また、別の例として、レトロマーとよばれるタンパク質複合体があげられる。レトロマーはエンドソーム膜においてコートタンパク質として機能するが、Rab7 のエフェクタータンパク質としても機能しており、Rab7 はレトロマーとの相互作用を介してトランスゴルジネットワークに輸送される積み荷タンパク質の選別と小胞の出芽にかかわっている²⁸⁾。

5. Rab タンパク質による被覆小胞の脱コート

ほとんどの輸送小胞はコートタンパク質によりおおわれているため、標的となる膜に融合するまえにコートタンパク質を小胞膜から脱離（脱コート）する必要がある。ここでは、クラスリン依存性エンドサイトーシスののちの脱コートを例に、その分子機構を説明する。細胞膜に存在す

るリン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸を認識してクラスリンアダプター複合体である AP-2 が弱く結合すると、特定のキナーゼ AAK が AP-2 の μ サブユニットをリン酸化することにより AP-2 の細胞膜への結合は安定化する。つぎに、AP-2 がトランスフェリン受容体などの積み荷タンパク質を認識してクラスリンを集合させることにより、被覆小胞が形成される²⁹⁾。このクラスリン被覆小胞には Rab5 が存在しており、Rab5 とその GEF である GAPVD1 (hRME-6) が協調してクラスリン被覆小胞を脱コートさせる³⁰⁾。すなわち、GAPVD1 は被覆小胞から AAK を解離させたり、あるいは、Rab5 のエフェクタータンパク質であるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼやホスファチジルイノシトールホスファターゼをリクルートすることで細胞膜からもち込まれたホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸のレベルを低下させたりすることにより、クラスリン被覆小胞の脱コートをひき起こすものと考えられている。

6. Rab タンパク質による輸送小胞の移動

供与側のオルガネラ膜から出芽した輸送小胞は微小管やアクチンフィラメントといった細胞骨格にそって運ばれ目的地のオルガネラに到達する。微小管は核の近傍に存在する微小管形成中心から細胞の辺縁にむかって延びており、辺縁部にむかう順行輸送にはキネシンモータータンパク質が、反対の方向にむかう逆行輸送にはダイニンモータータンパク質が機能する。これらのモータータンパク質と輸送小胞とをつなげるリンカーとして、Rab タンパク質は重要な役割を担っている^{31,32)}。たとえば、エンドソームに存在する Rab14 を認識してキネシン-3 が直接に結合することにより、FGF 受容体のゴルジ体からエンドソームへの順行輸送が制御されている³³⁾。また、ゴルジ体中存在する Rab6 のエフェクタータンパク質として Rabkinesin-6 が報告されているが、これはキネシン-6 のサブユニットとして知られ、細胞質分裂に重要な役割をはたしている³⁴⁾。以上は、Rab タンパク質とキネシンモータータンパク質との直接的な相互作用によるものだが、小胞膜にある Rab タンパク質がエフェクタータンパク質を介しキネシンモータータンパク質と間接的に相互作用するケースも報告されている。たとえば、Rab3 は DENN/MADD を介してキネシンモータータンパク質に相互作用し、Rab3 陽性小胞をニューロンの軸索にそって順行方向に輸送する³⁵⁾。また、小胞体やゴルジ体中存在する Rab1A はメラノサイト（色素細胞）にあるメラノソームにも存在しその順行輸送を制御しているが、ここにも、Rab1A とキネシンモータータンパク質とをつなぐエフェクタータンパク質の存在が想定されている³⁶⁾。

微小管を逆行方向に輸送するダイニンモータータンパク質と Rab タンパク質との関係についても多くの報告がある。たとえば、後期エンドソームに局在する Rab7 はエ

フェクタータンパク質である RILP を介してダイニンとダイナクチンからなる複合体と相互作用し、後期エンドソームの逆行輸送を制御している¹⁶⁾。また、メラノソームに局在する Rab36 は、同じく Rab36 のエフェクタータンパク質でもある RILP を介してダイニンとダイナクチンからなる複合体と相互作用し、メラノソームの逆行輸送を制御している³⁷⁾。

輸送小胞は微小管を長距離にわたりダイナミックに動くのに対し、アクチンフィラメントではミオシンモータータンパク質のはたらきにより短距離の局所的な動きをし、そのうち、細胞膜へと輸送される。Rab タンパク質とミオシンモータータンパク質との関連性でよく研究されているものとして、Rab27A の例があげられる (図 4a)。メラノソームに局在する Rab27A はエフェクタータンパク質である Slac2-a (melanophilin とよばれる) を介してミオシン Va と相互作用することにより、メラノソームの微小管からアクチンフィラメントへの受け渡し、そして、アクチンフィラメントにおける局所的な動きを制御している³⁸⁾。さらに、Rab27A は Slac2-a とは異なるエフェクタータンパク質である Slp2-a に結合の相手を変えてメラノソームを細胞膜に繫留する³⁸⁾。ほかの例としては、シナプス後部における神経伝達物質受容体のエンドサイトーシスとリサイクリングによる発現制御機構に対する Rab11 とミオシン Vb の関与があげられる。長期増強 (LTP : long-term potentiation) の過程において、AMPA 型グルタミン酸受容体を含む Rab11 陽性小胞は Rab11 のエフェクタータンパク質である FIP2 を介してミオシン Vb と相互作用することにより、シナプス後膜に輸送される³⁹⁾。このように、小胞膜あるいはオルガネラ膜にある Rab タンパク質とモータータンパク質をつなぐ例は枚挙にいとまがなく³¹⁾、オルガネラに特異的な小胞輸送における特異性を示唆するものと考えられる。

7. Rab タンパク質による繫留および膜融合

一般的に、輸送小胞は最初に繫留タンパク質による相互作用 (繫留あるいはドッキングとよばれる) を介して目的地となるオルガネラと結合する。そのうち、SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) タンパク質の作用により輸送小胞と標的となる膜との融合が起こる。この過程においても Rab タンパク質は繫留タンパク質および SNARE タンパク質と相互作用し、繫留から融合のステップに深く関与している。繫留タンパク質は、ひとつの比較的大きなタンパク質によるものと、多くのサブユニットから構成されるタンパク質複合体によるものの、大きく 2 つのグループに分けることができる。ひとつのタンパク質によるものとしては、コイルドコイルタンパク質 (p115, GM130, GCC185 などのゴルジ体に局在するゴルジファミリータンパク質や、EEA1 などの Rab5 エフェクタータンパク質) やシナプトタグミン様タンパク質などの報告

がある。また、タンパク質複合体によるものとしては、HOPS/Vps-C 複合体, Exocyst 複合体, COG 複合体, GARP/VFT 複合体, TRAPP 複合体などの報告がある⁴⁰⁾。

小胞体や小胞体-ゴルジ体中間区画 (ERGIC : ER-Golgi intermediate compartment) からシスゴルジに輸送される COPII 小胞には Rab1 が存在しており、ひとつの説として、以下のモデルが提唱されている。Rab1 が繫留タンパク質である p115 を COPII 小胞にリクルートし、シスゴルジ側には Rab1 のエフェクタータンパク質である GM130 が待機している。そして、GM130 と p115 とが複合体を形成し繫留タンパク質として機能することにより、シスゴルジへ小胞が繫留される⁴¹⁾。さらに、GM130 は Syntaxin-5 などの SNARE タンパク質と相互作用するこ

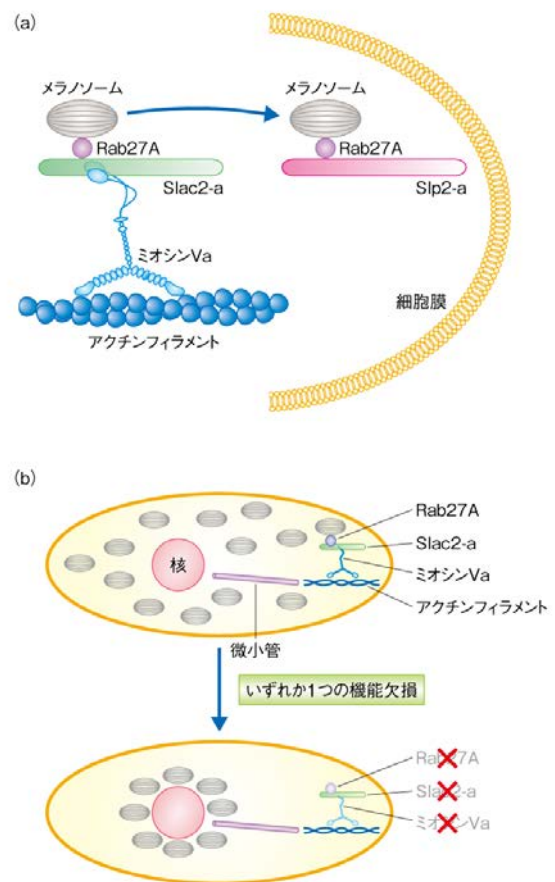


図 4 メラノソームの輸送と Rab27A

(a) 微小管からアクチンフィラメントに受け渡されるメラノソームには Rab27A が存在し、そのエフェクタータンパク質である Slac2-a を介しモータータンパク質であるミオシン Va がメラノソームにリクルートされる。そのうち、Rab27A はもうひとつのエフェクタータンパク質である Slp2-a に結合の相手を変えることにより、メラノソームは細胞膜に繫留される。

(b) Rab27A, Slac2-a, ミオシン Va のいずれかひとつでも機能欠損を起こすと、この三者複合体により制御されるメラノソームのアクチン輸送に異常をきたし、メラノソームは微小管を逆行輸送されることにより核の周辺に凝集する。

とにより、小胞のシスゴルジへの融合が促進される⁴²⁾。

シナプトタグミン様タンパク質はその N 末端側に存在する SHD ドメインを介して Rab27 と特異的に結合し、分泌小胞の細胞膜への繫留にかかわる。内分泌細胞株の PC12 細胞においては、ホルモン顆粒（有芯顆粒ともよばれる）に Rab27A が局在し、エフェクタータンパク質である rabphilin との結合を介して細胞膜に存在する SNAP25 と結合することにより、ホルモン顆粒を細胞膜に繫留する⁴³⁾。

初期エンドソームに存在する Rab5 は、その常時活性化型の変異体を発現させると巨大なエンドソームが誘導されるなど、エンドソームの融合に深くかかわっている。Rab5 は EEA1 や Rabenosyn-5 といったエフェクタータンパク質を Rab5 陽性エンドソームにリクルートし、リクルートされた EEA1 はそのコイルドコイルドメインを介して二量体化することにより Rab5 陽性エンドソームどうしを繫留する⁴⁴⁾。また、EEA1 は Syntaxin-6 などのエンドソームの SNARE タンパク質とも会合し、Rab5 陽性エンドソームの融合を促進する⁴⁴⁾。さらに、Rab5 のエフェクタータンパク質にはホスファチジルイノシトール 3-キナーゼやホスファチジルイノシトール 4-ホスファターゼあるいはホスファチジルイノシトール 5-ホスファターゼなどがあり、Rab5 陽性エンドソームにホスファチジルイノシトール 3-リン酸を濃縮させる。このため、ホスファチジルイノシトール 3-リン酸を特異的に認識する FYVE ドメインをもつ EEA1 や Rabenosyn-5 は、Rab5 陽性エンドソームにさらに保持されやすくなる。したがって、小胞の繫留や融合には低分子量 G タンパク質だけでなく、ホスファチジルイノシトールの機能も重要と考えられる⁴⁵⁾。

細胞膜はすべてが均一ではなく、特殊な膜ドメイン構造をもつことにより細胞機能の維持に重要な役割をはたしている。この細胞膜の特異的なドメインへの物質輸送を極性輸送とよぶ。たとえば、多くの細胞には 1 次繊毛（規則的な配置をとる微小管からなる軸系により、細胞膜の一部が外側に突き出た構造）という小さな突起構造がある。ここにはロドプシンやソマトスタチン受容体などの G タンパク質共役受容体が豊富に含まれており、細胞外の環境を感知するためのセンサー構造として注目されている。1 次繊毛に極性輸送されるリサイクリングエンドソームには Rab11 が存在し、エフェクタータンパク質である Rabin8 を小胞にリクルートする。Rabin8 は Rab8 の GEF 活性をもつため、Rab8 もこの小胞にリクルートされる。つぎに、Rab8 は Sec15 との結合を起点として小胞に Exocyst 複合体をリクルートし細胞膜に繫留する⁴⁶⁾ (図 5a)。なお、Exocyst 複合体は 8 つのサブユニットからなる巨大なタンパク質複合体であり、トランスゴルジネットワークやリサイクリングエンドソームからの輸送小胞を細胞膜へ繫留する役割を担っている⁴⁷⁾。また、極性輸送は上皮細胞の頂端・基部極性の形成にも重要な役割をはたしており、

Rab8A ノックアウトマウスでは頂端部の細胞膜への極性輸送の異常による小腸微絨毛萎縮の症状を示す⁴⁸⁾。

8. Rab カスケード

あるひとつのオルガネラが成熟段階を変化させると、それにもない Rab タンパク質の変換が生じる。たとえば、エンドソームの成熟の過程をみてみると、初期エンドソーム膜に局在する Rab5 は後期エンドソーム膜には存在せず、代わりに Rab7 が存在している。この過程では、まず、Rab5 は HOPS 複合体をエンドソーム膜にリクルートする。HOPS 複合体は Rab7 の GEF として機能する Vps39 をサブユニットとしてもつことから、つぎに、エンドソーム膜に Rab7 がリクルートされる⁴⁹⁾ (図 5b)。一方、線虫の後期エンドソームでは Rab5 の GAP が機能することにより Rab5 が取り除かれるという報告があるものの⁵⁰⁾、脊椎動物においては Rab5 の GAP の関与は明らかではない。このように、Rab タンパク質の変換は Rab のエフェクタータンパク質、および、GEF あるいは GAP による連続的で調和のとれたはたらきにより実行されるため、“Rab カスケード”とよばれている。この Rab カスケードはメンブ

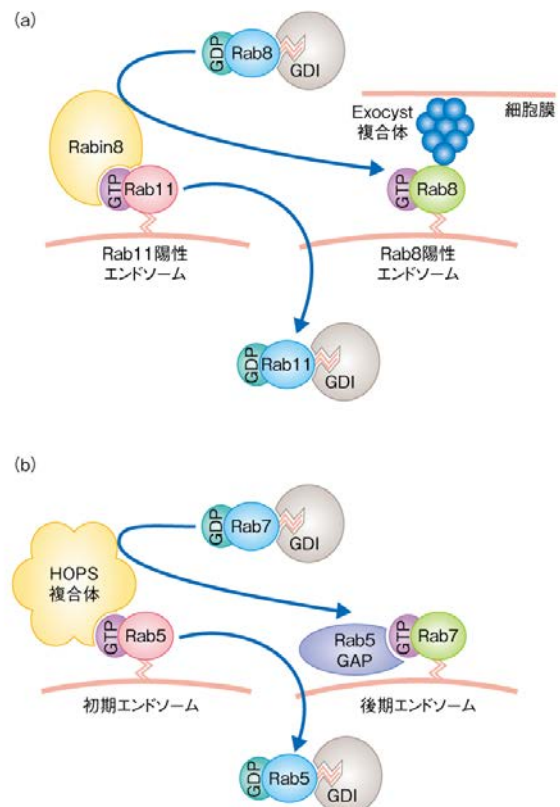


図 5 Rab カスケード

(a) 繊毛に輸送される輸送小胞が Exocyst 複合体により繫留される際には、Rab11 から Rab8 への変換 (Rab11→Rabin8→Rab8→Exocyst 複合体) が起こる。

(b) 初期エンドソームが後期エンドソームに分化する際には、Rab5 から Rab7 への変換 (Rab5→HOPS 複合体→Rab7→Rab5-GAP) が起こる。

レントラフィックのさまざまな局面において認められる。さきに述べた 1 次繊毛の形成の過程における Rab11 から Rab8 のカスケード (図 5a) もこの一例であり⁴⁶⁾, Rabin8 のように, 1 分子内に上流となる Rab タンパク質 (ここでは, Rab11) の活性化型との結合ドメイン (Rab 結合ドメイン) と, 下流となる Rab タンパク質 (ここでは, Rab8) の活性化ドメイン (GEF ドメイン) とをあわせもつタンパク質が機能する局面では, Rab カスケードが機能している場合が多い。しかし, 1 分子内に存在する Rab 結合ドメインと GEF ドメインとが別々の生理機能を担っている場合もあるので注意が必要である⁵¹⁾。

9. Rab タンパク質の機能不全と疾患

これまで述べてきたように, Rab タンパク質はさまざまなメンブレントラフィックにおけるキーファクターであるため, Rab タンパク質それ自体の異常だけでなく, その活性化を制御するタンパク質やエフェクタータンパク質の異常はさまざまな疾患をひき起こす⁵²⁾。また最近では, 病原性微生物が宿主側の Rab タンパク質を巧妙に用いることにより感染を成立させていることなども明らかになってきている⁵³⁾。ここでは, それらの代表例をいくつか紹介する。

Rab タンパク質とがんとの関連性を示す報告は数多くあるが, よく理解されている例としては Rab25 があげられる。Rab25 は Rab11 と類似しており (Rab11C とよばれることもある), 卵巣がんや乳がんにおいて高発現している。とくに, Rab25 は CLIC3 と協調的に機能し, エンドサイトーシスされた $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンをリサイクリングさせて仮足 (pseudopodia) へと輸送する。これにより細胞の移動を促進させ, がん細胞の転移に関与するものと考えられている⁵⁴⁾。

先天性疾患の代表例としては, メラノソームのアクチンフィラメントにそった輸送 (アクチン輸送) を制御する Rab27A, Slac2-a, ミオシン Va からなる三者複合体のいずれかの異常により色素異常の症状を示す Griscelli 症候群があげられる。ミオシン Va の異常は 1 型 Griscelli 症候群, Rab27A の異常は 2 型 Griscelli 症候群, Slac2-a の異常は 3 型 Griscelli 症候群の原因となる³⁸⁾。メラノソームのアクチン輸送に異常が生じると, メラノソームは微小管からアクチンフィラメントへと受け渡されず, 微小管を逆行性にもどってしまい核の近傍に凝集する (図 4b)。このため, メラノソームはメラノサイトから隣接する毛母細胞や皮膚角化細胞へと受け渡されずに色素異常の症状を示す。また, 2 型 Griscelli 症候群は色素異常にくわえ免疫疾患をとまうが, これは Rab27A がメラノソームだけでなく, 細胞傷害性 T 細胞や好中球からの顆粒の放出にも関与しているためである³⁸⁾。ほかにも, Rab3A, Rab7, Rab18, Rab23, Rab33B, Rab38, Rab39B などの変異によりヒトやマウスにおいて疾患が発症することが知られており,

詳細は文献を参照されたい⁵²⁾。

新規に合成された Rab タンパク質のシャペロンとして機能する REP1 に異常が生じると, 先天性脈絡膜欠如 (choroideremia) を発症する。おそらく, ほかの組織に REP2 が存在し相補的に機能しているため, このように限定された組織において疾患が発症するものと思われる。また, 同じく Rab タンパク質のシャペロンである GDI α に異常があると X 連鎖精神遅滞 (X-linked mental retardation) の症状を示す。Rab3 はシナプス小胞に存在しその分泌に深くかかわることから GDI α のターゲットの候補として Rab3 が考えられており, 実際に, Rab3 の GAP に異常が生じると Warburg Micro 症候群や Martsolf 症候群といった神経疾患がひき起こされる。

病原性微生物の例としては, リステリア菌, ピロリ菌, レジオネラ菌, サルモネラ菌, クラミジア菌などの真正細菌の感染における Rab タンパク質の報告があるが⁵³⁾, 基本的には, 宿主の細胞に取り込まれたこれらの真正細菌が宿主の Rab タンパク質にはたらきかけ, リソソームをはじめとする異物認識機構からうまくまぬがれる手段を獲得するものである。たとえば, 食中毒をひき起こすサルモネラ菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) がエンドサイトーシスによりマクロファージなどに侵入すると, エンドソームの内部において増殖するが, そのままだと, この小胞はリソソームと融合しサルモネラ菌は宿主から排除される運命にある。しかし興味深いことに, この小胞ではリソソームにリクルートされるべき酸性加水分解酵素が排除されている。これは, サルモネラ自体がコードするタンパク質 SifA により, Rab9 依存性のマンノース 6-リン酸受容体のトランスゴルジネットワークへの逆行輸送が阻害され, マンノース 6-リン酸受容体のリサイクリングが抑制されることによりリソソームに輸送されるべき酸性加水分解酵素が減少する, といった巧妙な戦略によるものである⁵⁵⁾。

おわりに

現在のところ, Rab タンパク質は哺乳動物において 60 種類以上ものアイソフォームが存在する。ここで述べたように, Rab1 や Rab5 をはじめその機能のよく理解されているものもあるが, 多くの Rab タンパク質はまだその機能はよく理解されていない。また, いまだ多くの Rab タンパク質において, 対応するエフェクタータンパク質や GEF あるいは GAP は同定されていない^{7,56)}。したがって, 機能未知の Rab タンパク質に着目し, 新しいエフェクタータンパク質や GEF あるいは GAP を探索しその機能の解明に取り組むことは, メンブレントラフィックの新たな局面を解き明かす可能性をひめている。さきに述べた Rab12 の機能の発見, すなわち, リサイクリングエンドソームからリソソームにつながる経路の発見などは, その

好例ではないかと考えられる^{19,20}。その一方で、Rab5やRab27などのように、ひとつのRabタンパク質に複数のエフェクタータンパク質の存在するケースもある。たとえば、メラノソームのアクチン輸送を制御するRab27A, Slac2-a, ミオシンVaの相互作用は、細胞膜に繫留される際には、Rab27AとSlp2-aとの相互作用に変化する。このエフェクタータンパク質の交換はSlac2-aとSlp2-aのRab27Aに対する親和性の違いによりある程度は説明できるものの³⁸、本当のところはよくわかっていない。したがって、ひとつのRabタンパク質に対する複数のエフェクタータンパク質の使い分けがどのように制御されているのかを明らかにできれば、メンブレントラフィックの連続した流れの理解が飛躍的に向上するものと考えられる。そのためには、活性化型のRabタンパク質を生細胞イメージング法により高解像度に検出する技術が、ますます有用になってくるものと予想される⁵⁷。

文献

- 1) Klopper, T. H., Kienle, N., Fasshauer, D. et al.: Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol.*, 10, 71 (2012)
- 2) Hutagalung, A. H. & Novick, P. J.: Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.*, 91, 119-149 (2011)
- 3) Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O. et al.: Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.*, 13, 5262-5273 (1994)
- 4) Andres, D. A., Seabra, M. C., Brown, M. S. et al.: cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell*, 73, 1091-1099 (1993)
- 5) Pfeffer, S. R.: Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.*, 11, 487-491 (2001)
- 6) Pfeffer, S. R.: Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *J. Biol. Chem.*, 280, 15485-15488 (2005)
- 7) Fukuda, M.: TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci. Rep.*, 31, 159-168 (2011)
- 8) Collins, R. N.: "Getting it on": GDI displacement and small GTPase membrane recruitment. *Mol. Cell*, 12, 1064-1066 (2003)
- 9) Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T. et al.: Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J.*, 25, 13-23 (2006)
- 10) Sivars, U., Aivazian, D. & Pfeffer, S. R.: Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature*, 425, 856-859 (2003)
- 11) Fukuda, M.: Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 2801-2813 (2008)
- 12) Sano, H., Roach, W. G., Peck, G. R. et al.: Rab10 in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Biochem. J.*, 411, 89-95 (2008)
- 13) Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M. et al.: rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell*, 64, 915-925 (1991)
- 14) van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P. et al.: The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, 70, 729-740 (1992)
- 15) Simpson, J. C., Griffiths, G., Wessling-Resnick, M. et al.: A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J. Cell Sci.*, 117, 6297-6311 (2004)
- 16) Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W. et al.: Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150^{Glued}, ORP1L, and the receptor β III spectrin. *J. Cell Biol.*, 176, 459-471 (2007)
- 17) Weigert, R., Yeung, A. C., Li, J. et al.: Rab22a regulates the recycling of membrane proteins internalized independently of clathrin. *Mol. Biol. Cell*, 15, 3758-3770 (2004)
- 18) Kawauchi, T., Sekine, K., Shikanai, M. et al.: Rab GTPases-dependent endocytic pathways regulate neuronal migration and maturation through N-cadherin trafficking. *Neuron*, 67, 588-602 (2010)
- 19) Matsui, T., Itoh, T. & Fukuda, M.: Small GTPase Rab12 regulates constitutive degradation of transferrin receptor. *Traffic*, 12, 1432-1443 (2011)
- 20) Matsui, T. & Fukuda, M.: Rab12 regulates mTORC1 activity and autophagy through controlling the degradation of amino-acid transporter PAT4. *EMBO Rep.*, 14, 450-457 (2013)
- 21) Allan, B. B., Moyer, B. D. & Balch, W. E.: Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science*, 289, 444-448 (2000)
- 22) Ali, B. R., Wasmeier, C., Lamoreux, L. et al.: Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J. Cell Sci.*, 117, 6401-6412 (2004)
- 23) Figueiredo, A. C., Wasmeier, C., Tarafder, A. K. et al.: Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide

- exchange factor for Rab27a in melanocytes. *J. Biol. Chem.*, 283, 23209-23216 (2008)
- 24) Blumer, J., Rey, J., Dehmelt, L. et al.: RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J. Cell Biol.*, 200, 287-300 (2013)
- 25) Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I. et al.: Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science*, 292, 1373-1376 (2001)
- 26) Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H. M. et al.: A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*, 90, 1149-1159 (1997)
- 27) Aivazian, D., Serrano, R. L. & Pfeffer, S.: TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *J. Cell Biol.*, 173, 917-926 (2006)
- 28) Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G. A. et al.: Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J. Cell Biol.*, 183, 513-526 (2008)
- 29) Jackson, A. P., Flett, A., Smythe, C. et al.: Clathrin promotes incorporation of cargo into coated pits by activation of the AP2 adaptor μ 2 kinase. *J. Cell Biol.*, 163, 231-236 (2003)
- 30) Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E. et al.: Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J. Cell Biol.*, 183, 499-511 (2008)
- 31) Akhmanova, A. & Hammer, J. A. III.: Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22, 479-487 (2010)
- 32) Ohbayashi, N. & Fukuda, M.: Role of Rab family GTPases and their effectors in melanosomal logistics. *J. Biochem.*, 151, 343-351 (2012)
- 33) Ueno, H., Huang, X., Tanaka, Y. et al.: KIF16B/Rab14 molecular motor complex is critical for early embryonic development by transporting FGF receptor. *Dev. Cell*, 20, 60-71 (2011)
- 34) Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O. et al.: Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science*, 279, 580-585 (1998)
- 35) Niwa, S., Tanaka, Y. & Hirokawa, N.: KIF1B β and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat. Cell Biol.*, 10, 1269-1279 (2008)
- 36) Ishida, M., Ohbayashi, N., Maruta, Y. et al.: Functional involvement of Rab1A in microtubule-dependent anterograde melanosome transport in melanocytes. *J. Cell Sci.*, 125, 5177-5187 (2012)
- 37) Matsui, T., Ohbayashi, N. & Fukuda, M.: The Rab interacting lysosomal protein (RILP) homology domain functions as a novel effector domain for small GTPase Rab36: Rab36 regulates retrograde melanosome transport in melanocytes. *J. Biol. Chem.*, 287, 28619-28631 (2012)
- 38) Fukuda, M.: Versatile role of Rab27 in membrane trafficking: focus on the Rab27 effector families. *J. Biochem.*, 137, 9-16 (2005)
- 39) Wang, Z., Edwards, J. G., Riley, N. et al.: Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell*, 135, 535-548 (2008)
- 40) Bonifacino, J. S. & Hierro, A.: Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the *trans*-Golgi network. *Trends Cell Biol.*, 21, 159-167 (2011)
- 41) Short, B., Haas, A. & Barr, F. A.: Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta*, 1744, 383-395 (2005)
- 42) Diao, A., Frost, L., Morohashi, Y. et al.: Coordination of golgin tethering and SNARE assembly: GM130 binds syntaxin 5 in a p115-regulated manner. *J. Biol. Chem.*, 283, 6957-6967 (2008)
- 43) Fukuda, M.: Rab27 and its effectors in secretory granule exocytosis: a novel docking machinery composed of a Rab27-effector complex. *Biochem. Soc. Trans.*, 34, 691-695 (2006)
- 44) Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S. et al.: EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, 394, 494-498 (1998)
- 45) Shin, H. W., Hayashi, M., Christoforidis, S. et al.: An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J. Cell Biol.*, 170, 607-618 (2005)
- 46) Knodler, A., Feng, S., Zhang, J. et al.: Coordination of Rab8 and Rab11 in primary ciliogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 6346-6351 (2010)
- 47) Das, A. & Guo, W.: Rabs and the exocyst in ciliogenesis, tubulogenesis and beyond. *Trends Cell Biol.*, 21, 383-386 (2011)
- 48) Sato, T., Mushiaki, S., Kato, Y. et al.: The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature*, 448, 366-369 (2007)
- 49) Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. et al.: Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-749 (2005)
- 50) Chotard, L., Mishra, A. K., Sylvain, M. A. et al.: TBC-2 regulates RAB-5/RAB-7-mediated endosomal

trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell*, 21, 2285-2296 (2010)

51) Ohbayashi, N., Yatsu, A., Tamura, K. et al.: The Rab21-GEF activity of Varp, but not its Rab32/38 effector function, is required for dendrite formation in melanocytes. *Mol. Biol. Cell*, 23, 669-678 (2012)

52) Seixas, E., Barros, M., Seabra, M. C. et al.: Rab and Arf proteins in genetic diseases. *Traffic*, DOI: 10.1111/tra.12072

53) Stein, M. P., Muller, M. P. & Wandinger-Ness, A.: Bacterial pathogens commandeer Rab GTPases to establish intracellular niches. *Traffic*, 13, 1565-1588 (2012)

54) Dozynkiewicz, M. A., Jamieson, N. B., Macpherson, I. et al.: Rab25 and CLIC3 collaborate to promote integrin recycling from late endosomes/lysosomes and drive cancer progression. *Dev. Cell*, 22, 131-145 (2012)

55) McGourty, K., Thurston, T. L., Matthews, S. A. et al.: *Salmonella* inhibits retrograde trafficking of mannose-6-phosphate receptors and lysosome function. *Science*, 338, 963-967 (2012)

56) Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H. et al.: Comprehensive screening for novel Rab-binding

proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs. *Traffic*, 11, 491-507 (2010)

57) Aoki, K. & Matsuda, M.: Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nat. Protoc.*, 4, 1623-1631 (2009)

著者プロフィール

大林 典彦 (Norihiko Ohbayashi)

略歴: 2002年 京都大学大学院薬学研究科 修了, 同年 岡崎統合バイオサイエンスセンター 博士研究員, 2005年 北海道大学大学院薬学研究科 助手を経て, 2008年より東北大学大学院生命科学研究科 助手 (現 助教).

研究テーマ:メラノソームの形成や細胞骨格における輸送にかかわる分子機構の探求とその普遍性の追究.

福田 光則 (Mitsunori Fukuda)

東北大学大学院生命科学研究科 教授.

研究室 URL :

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/fukuda_lab/home-ja.html