



東北大学

報道機関各位

平成 26 年 3 月 6 日
東北大学大学院生命科学研究科

メラノソーム上にタンパク質分子を送り届ける新技術を開発

～ メラノソームターゲティング (MST) タグの開発 ～

【ポイント】

- ・メラノソームにはメラニン色素の合成に必要な分子などが特異的に輸送されるが、メラノソームへの輸送に必要なシグナルはこれまで未解明
- ・メラノソーム上に局在する分子のメラノソームへの輸送に必要な領域を決定し、メラノソームターゲティング (MST) タグを開発
- ・MST タグを融合させた様々なタンパク質分子をメラノソームに局在化させることに成功

【概要】

国立大学法人東北大学は、メラノソーム上に人為的にタンパク質分子を送り届ける新技術を開発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石田森衛修士大学院生、荒井沙希修士大学院生、福田光則教授らによる研究成果です。

わたしたちの肌や髪の色之源であるメラニン色素は、メラノソーム^{*1}と呼ばれる特殊な袋(小胞)の中で合成・貯蔵されています。メラノソームにはメラニン合成酵素のような特殊なタンパク質分子が多数存在していますが、これらのタンパク質がどのようなシグナル(配列)^{*2}によってメラノソームに輸送されているかはこれまで良く分かっていませんでした。

今回、研究グループはメラノソーム上に局在することが知られているメラノレギュリン^{*3}分子に着目し、この分子のメラノソームへの局在化に必要な領域を決定し、「メラノソームターゲティングタグ (MST tag, melanosome-targeting tag)」を新規に開発しました。この MST タグを融合させたタンパク質分子をマウスの培養メラノサイトに発現させると、本来メラノソームに局在しない分子を人為的にメラノソームに局在化させることに初めて成功しました。また、この技術の応用例として、アミノ酸変異によりメラノソームに局在化することが出来ない Rab27A 分子^{*4}がメラノソームの輸送障害を引き起こすことに着目し、この変異体 Rab27A に MST タグを融合することによりメラノソームに局在化させ、メラノソームの輸送を回復することにも成功しました。

今回のメラノソームターゲティング (MST) タグの開発により、メラノソーム上に任意のタンパク質分子を局在化させることが可能となり、メラノソームの形成や輸送の詳細な分子機構の解明、ひいてはそれらの人為的な制御に応用されることが期待されます。

本研究成果は、米国の科学雑誌『*Journal of Biological Chemistry*』電子版(2月28日付け)に掲載されました。

【背景】

わたしたちの肌や髪の毛に含まれる黒いメラニン色素は、有害な紫外線からわたしたちの体を守るために重要な役割を果たしています。しかし、その一方でメラニン色素の蓄積はしみやそばかすの原因に、あるいはメラニン色素の部分的な脱落は白斑の原因になっています。メラニン色素は、メラノサイト（メラニン色素産生細胞）に存在する「メラノソーム」^{*1}と呼ばれる袋（小胞）の中で合成・貯蔵されています。メラノソームにはメラニン合成酵素のような特殊なタンパク質分子が多数存在しており、これらの分子をメラノソームの袋にだけ運び込む（逆に、核や小胞体など他の袋に運ばない）必要があります（図1）。メラノソームで働く分子は、メラノソームに特異的に輸送されるためのシグナル（配列）^{*2}を含んでいると考えられています。このシグナルが分かるとメラノソームに人為的にタンパク質分子を運ぶことが可能となるため、多くの研究者が「メラノソームにタンパク質分子を送り届ける技術（ツール）」に興味を持っています。しかしこれまで、そのようなツールは開発されていませんでした。

【研究成果】

本研究では、メラノソームに局在することが知られているタンパク質の中で、メラノソームの輸送に関わるメラノレギュリン^{*3}という分子に着目しました。まず、この分子のメラノソームへの局在化に必要な領域を決定し、これらの領域を用いてメラノソームターゲティングタグ（MST tag, melanosome-targeting tag）を新規に開発しました（図2）。次に、得られた MST タグを本来メラノソームに局在しないタンパク質分子に融合し、得られた融合タンパク質のメラノソームへの局在化やメラノソームの分布に対する影響を検討しました（図3～図5）。その結果、以下のことを明らかにすることができました。

1. メラノレギュリン分子のアミノ末端領域（アミノ酸番号1～139：図2A）はメラノソームへの局在化に必要な不可欠な領域である。メラノレギュリン分子はメラノソームの微小管逆行性輸送に関与するが、この領域のみを発現してもメラノソームの形成や分布には影響を与えない（図2B,C）。
2. 上記1で決定した領域をメラノソームターゲティング（MST, melanosome-targeting）タグと命名し、MSTを融合したタンパク質分子がメラノソームに局在化することを確認した。例えば、初期エンドソームと呼ばれる別の膜に局在する Rab5A という分子に MST タグを融合すると、MST-Rab5A はメラノソーム上に局在する（図3）。
3. Q78L のアミノ酸変異を持つ Rab27A 分子^{*4}はメラノソームに局在化することができず、メラノソームの輸送障害を引き起こす（色素異常の症状を示すグリセリ症候群の特徴）^{*5}。この変異体 Rab27A に MST タグを融合すると、メラノソームに局在し、メラノソーム輸送が回復する（図4）。
4. Rab27A はメラノソーム上の荷札役として機能し、Slac2-a（運転手役）及びミオシン Va（運送トラック役）をメラノソーム上に呼び込むことによりメラノソーム輸送を促進する（図5A,B）。Rab27A を欠損するメラノサイトでは、荷札が無いため Slac2-a、ミオシン Va がメラノソームにアクセスできず、メラノソームの輸送障害を引き起こす。Rab27A に結合できない Slac2-a Δ SHD に MST タグを付加した MST-Slac2-a Δ SHD を Rab27A 欠損細胞に発現すると、MST-Slac2-a 分子はメラノソーム上に局在するため、ミオシン Va によってメラノソームの輸送が回復する（図5C）。

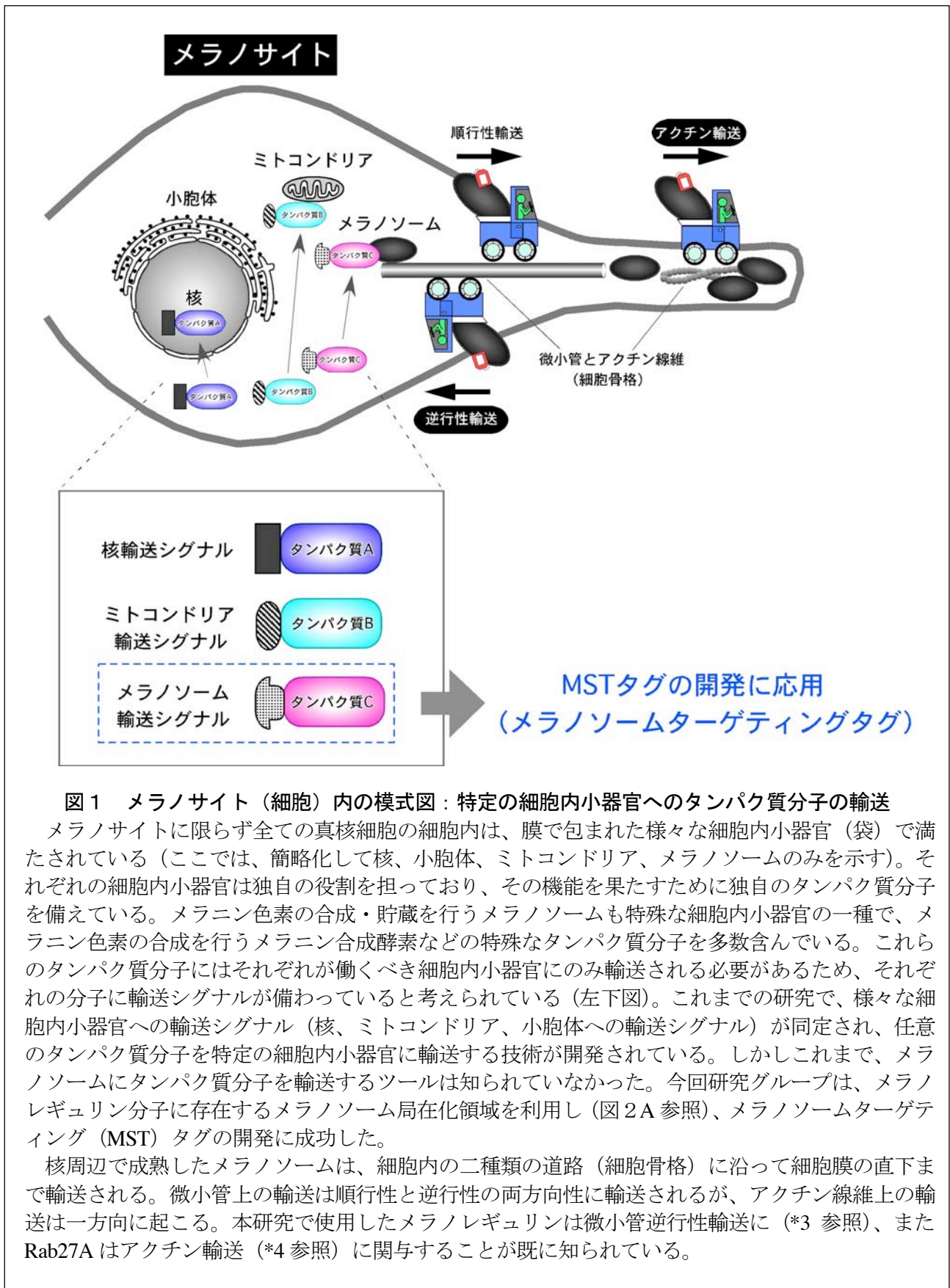
以上の結果から、MST タグは成熟メラノソーム上に人為的にタンパク質分子を局在化させる初めてのツールとして利用できることが明らかになりました。また、MST タグを融合させても、融合させた分子の機能を損なうことはなかったことから（例えば、Slac2-a 分子のミオシン Va 結合能など：図5）、タンパク質分子の機能を保持したままメラノソーム上に局在化させることが可能となりました。

【今後の展開】

今回の研究により、MST タグを用いて成熟メラノソーム上にタンパク質分子を送り届ける新技術が確立されました。2013 年度のノーベル生理学・医学賞の対象となった小胞（膜）輸送の研究分野では、特定の膜で出来た細胞内小器官（オルガネラ）への輸送シグナルが解明されることにより、その細胞内小器官の機能解明が飛躍的に向上してきました。今回の MST タグの開発により、メラノソーム上に任意のタンパク質分子あるいはその断片を局在化させることが可能となり、メラノソームの形成や輸送の詳細な分子機構の解明、ひいてはそれらの人為的な制御に応用されることが期待されます。

※本研究成果は、公益財団法人東京生化学研究会・研究助成金「メラノソームダイナミクスを制御する分子基盤の解明と創薬へのアプローチ」（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 基盤研究 C「色素細胞活性化における Varp の機能解析」（研究代表者：大林典彦 東北大学大学院生命科学研究科助教）、及び東北大学国際高等研究教育院（石田森衛修士研究教育院生）のサポートによるものです。

【図及び説明】



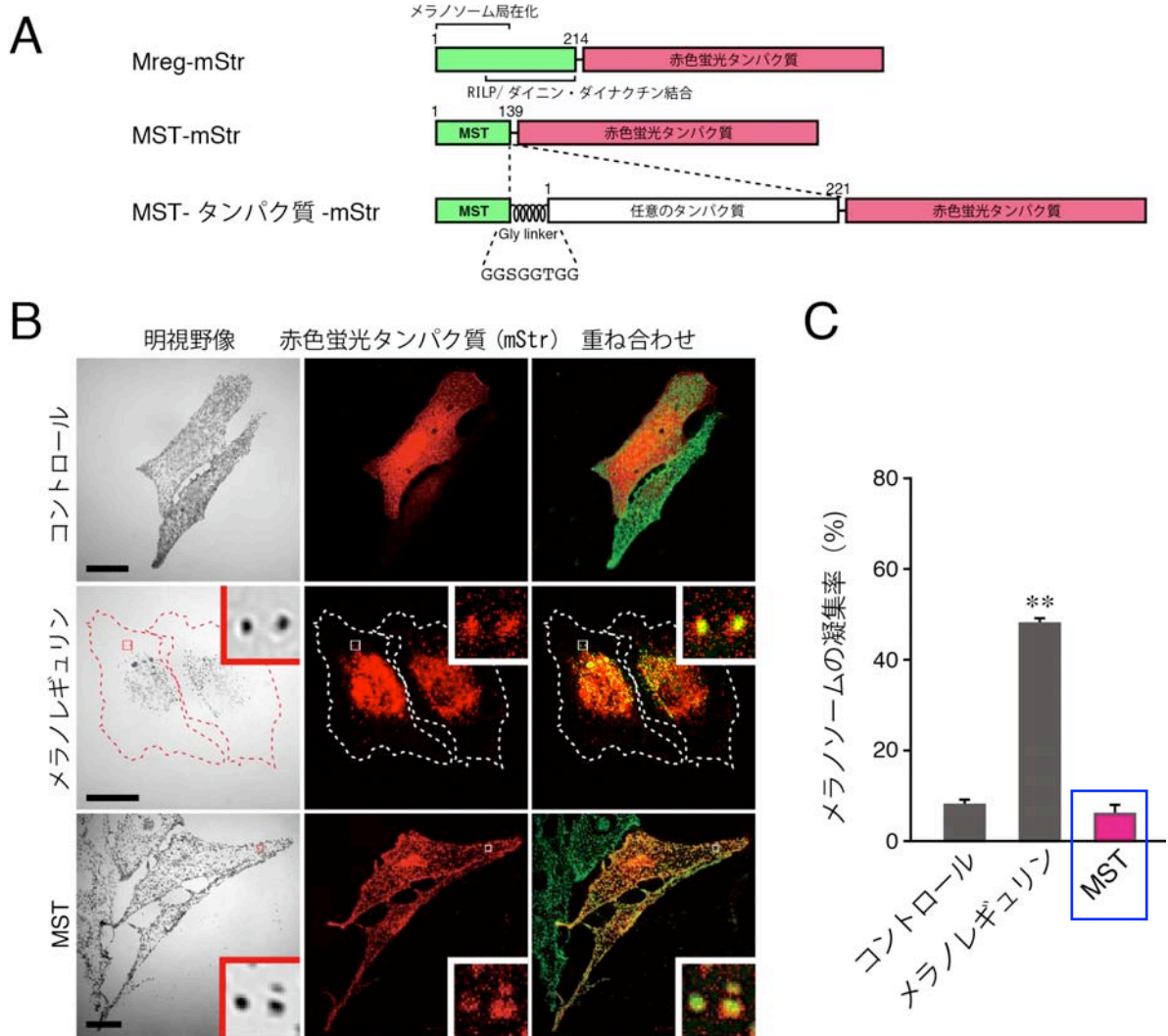


図2 メラノレギュリン分子を改変したメラノソームターゲティング (MST) タグ

(A) メラノレギュリン分子及び今回開発したメラノソームターゲティング (MST) タグの模式図。メラノレギュリン分子はメラノソームの微小管逆行性輸送に関わる分子で³、アミノ末端側でメラノソームに局在し、カルボシキル末端側で RILP やダイニン・ダイナクチン複合体と結合する。本研究では、アミノ末端側のメラノソームの局在化に必要な領域を MST と命名した。MST を融合したタンパク質を可視化するため、カルボシキル末端側には赤色蛍光タンパク質 (mStr) を融合している。任意のタンパク質 (例えば、図3の Rab5A や図4の Rab27A(Q78L)) を MST と mStr の間に挟んでメラノサイトに発現させると、メラノソーム上に局在する。(B) MST タグのメラノソーム局在化。mStr のみをメラノサイトに発現させても、メラノソーム上には局在しないが (上段)、メラノレギュリン (Mreg) 分子と mStr を融合した Mreg-mStr はメラノソーム上に局在し、微小管逆行性輸送を促進することによりメラノソームの核周辺での凝集を引き起こす (中段)。一方、MST タグのみを融合した MST-mStr はメラノソーム上に局在してもメラノソームの凝集を誘導しない。挿入図は四角の部分の拡大図を示し、右側の重ね合わせの図ではメラノソームを緑色の疑似カラーで示す。点線はメラノソームの凝集を起こした細胞の縁の部分を示す。スケールバー = 20 μ m。(C) Mreg-mStr 及び MST-mStr を発現するメラノサイトにおけるメラノソームの凝集率を示す。Mreg-mStr を発現する細胞では頻りにメラノソームの核周辺での凝集が観察されたが、MST-mStr ではメラノソームの分布には全く影響が認められなかった。**, $p < 0.01$, Student's unpaired t test.

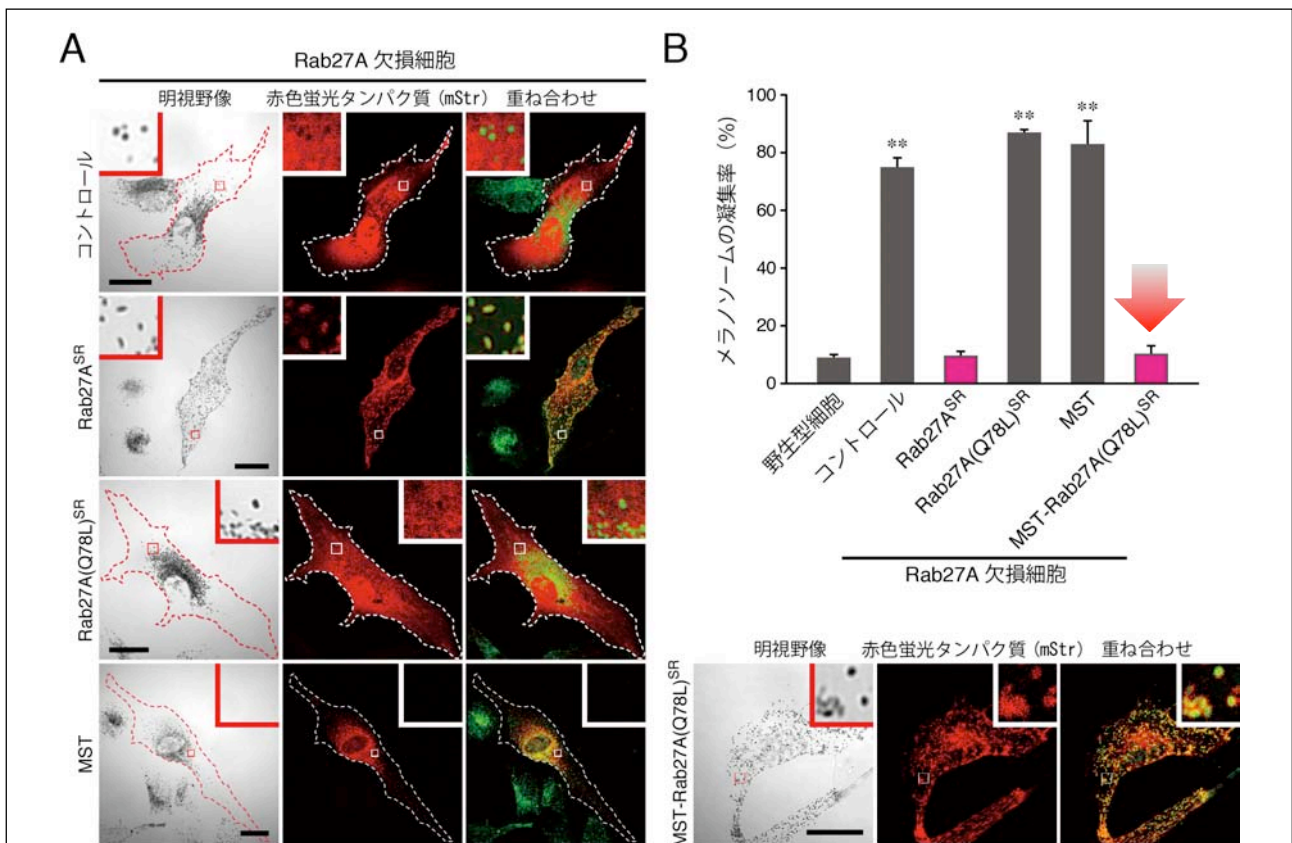
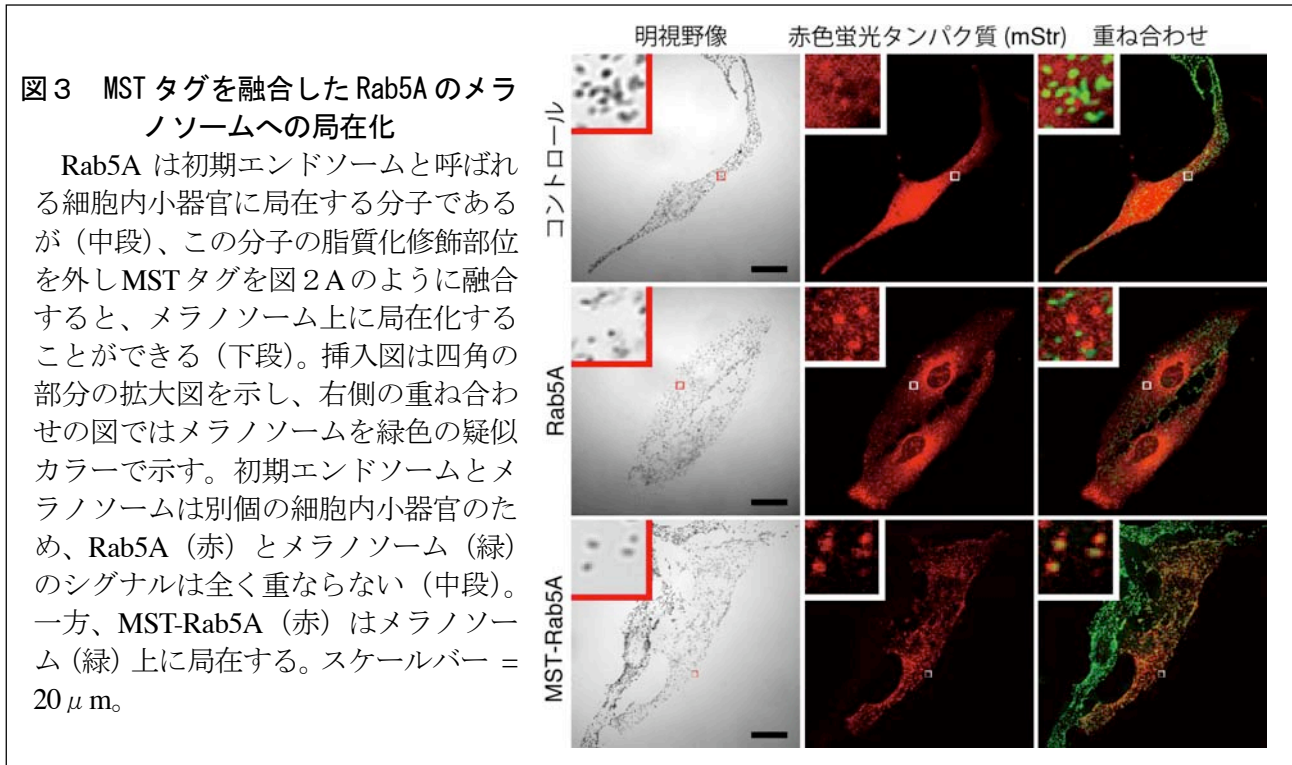


図4 MST タグを融合した Rab27A (Q78L) のメラノソームへの局在化とメラノソーム分布の回復

(A) RNA 干渉法により Rab27A を欠損させた細胞では、メラノソームのアクチン輸送が起こらず、メラノソームが核周辺で凝集する (左上段、*4 参照)。siRNA に抵抗性 (SR, siRNA-resistant) の Rab27A を Rab27A 欠損細胞に戻すとメラノソーム上に局在し、メラノソームの分布が回復する (左二段目)。Q78L の変異を持つ Rab27A 分子はメラノソームに局在できないため、メラノソームの分布は回復しない (左三段目)。一方、MST を融合した Rab27A(Q78L) はメラノソーム上に局在し、メラノソームの分布も回復するが (右段)、MST タグのみでは回復効果は認められない (左下段)。挿入図及び点線は図2Bの説明文に示した通りである。スケールバー = 20 μ m。(B) A に示すメラノサイトにおけるメラノソームの凝集率を示す。**, $p < 0.01$, Student's unpaired t test.

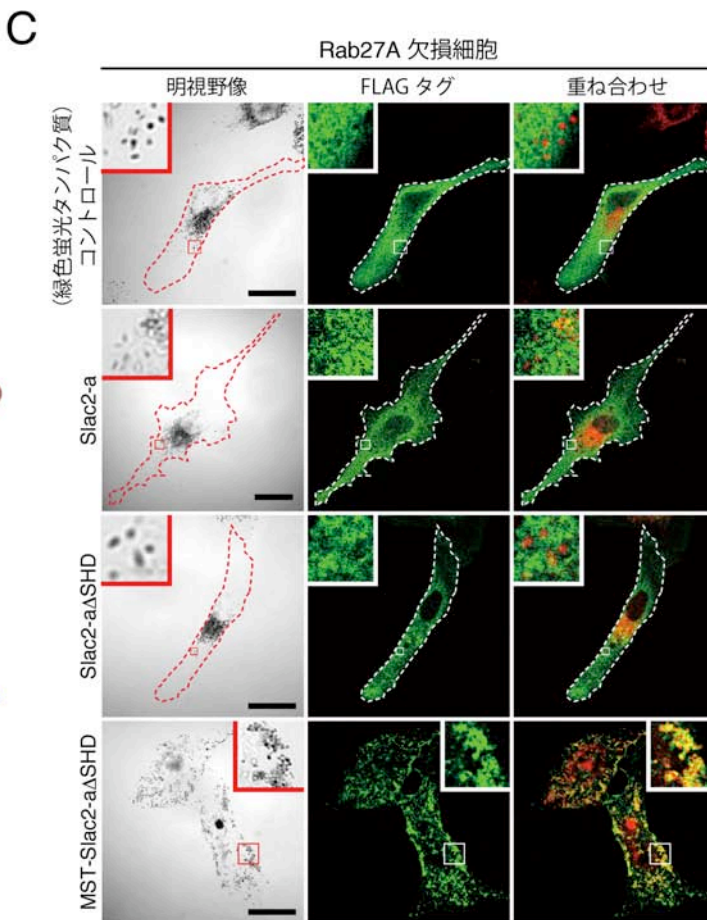
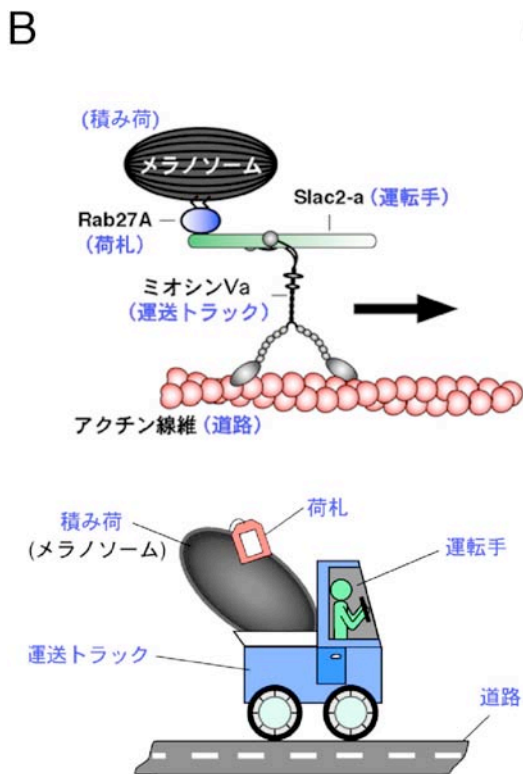


図5 MST タグを融合した Slac2-a Δ SHD のメラノソームへの局在化とメラノソーム分布の回復

(A) Slac2-a 分子及び MST タグを融合した Slac2-a Δ SHD 変異体の模式図。Slac2-a 分子 (メラノフィリンとも呼ばれる) はアミノ末端側にメラノソーム上の Rab27A (荷札役) を結合する SHD (Slp homology domain) 領域を、中央部分にモータータンパク質であるミオシン Va (運送トラック役) を結合する MBD (myosin Va binding domain) 領域を持つ。MST-Slac2-a Δ SHD は Rab27A を認識する SHD 領域を除き、代わりに MST を融合したものである。図5では融合タンパク質分子の検出のため、mStr の代わりに FLAG タグを使用している。

(B) Rab27A-Slac2-a-ミオシン Va 複合体によるメラノソームのアクチン輸送の模式図。メラノソームを積み荷、Rab27A を荷札、Slac2-a を運転手、ミオシン Va を運送トラック、アクチン線維を道路に例えて、それぞれの分子の機能を示している。Slac2-a 分子の SHD 領域を欠損させると荷札である Rab27A を認識できないため、メラノソーム上には局在できない。

(C) メラノソーム凝集を示す Rab27A 欠損細胞における MST-Slac2-a Δ SHD の発現。RNA 干渉法により Rab27A (荷札) を欠損させた細胞では、メラノソームが核周辺で凝集する (上段、*4 参照)。この細胞に Slac2-a や Slac2-a Δ SHD を発現させても、荷札役の Rab27A が無いため、メラノソームを認識できず、メラノソームの分布は回復しない (中央二段)。しかし、MST-Slac2-a Δ SHD は荷札の Rab27A に関係なくメラノソームに局在化でき、ミオシン Va とも結合できるため、メラノソームの分布が回復する (下段)。挿入図は四角の部分の拡大図を示し、右側の重ね合わせの図ではメラノソームを赤色の疑似カラーで示す。点線はメラノソームの凝集を起こした細胞の縁の部分を示す。スケールバー = 20 μ m。

【用語説明】

* 1 メラノソーム

細胞内には膜で包まれた細胞内小器官（オルガネラ）と呼ばれる袋状の構造物が多数存在しており、それぞれが特殊な役割を担っています。メラノソームはメラニン色素を合成・貯蔵するのに特化したオルガネラで、メラノサイト（メラニン色素産生細胞）と呼ばれる特殊な細胞にのみ存在しています。成熟したメラノソームはメラノサイトの細胞内を細胞骨格に沿って輸送され（図1の右上側参照）、肌や髪の毛を作る細胞に受け渡され、はじめて肌や髪の毛の暗色化が起こります。

* 2 輸送シグナル（配列）

細胞内には様々な機能を持つ細胞内小器官が存在しており、そこにはその器官でのみ働くタンパク質分子が多数存在しています。これらの分子には自身が働く場所に運ばれるための輸送シグナル（特異的なアミノ酸配列）が存在すると考えられています。他の細胞内小器官（核、小胞体、ミトコンドリアなど）では、既にそのような輸送シグナルが見つかっており、そのシグナルを融合することで特定の器官にタンパク質分子を送り届ける技術が確立しています。しかし、これまでメラノソーム上に任意のタンパク質分子を運ぶツールは開発されていませんでした。

* 3 メラノレギュリン (Mreg: melanoregulin)

メラノソームの微小管上の逆行性輸送を行う際の、メラノソーム上の荷札として機能します。メラノレギュリン分子は、アミノ末端側で脂質化修飾を受けてメラノソーム上に局在し、カルボシキル末端側でRILP（運転手役）・ダイニン・ダイナクチン複合体（運送トラック役のモータータンパク質）と結合することにより（図2A）、メラノソームを細胞辺縁部から中心方向へと微小管と呼ばれる道路に沿って輸送します（メラノソームの逆行性輸送に関する詳細は下記のURLを参照）。

プレスリリース（2012年1月30日）

『メラニン色素』の逆行性輸送の仕組みを解明 ～ 白髪予防の新たな分子標的として期待？ ～
(<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/newimg/pressimg/tohokuuniv-press20120130.pdf>)

* 4 低分子量Gタンパク質 Rab27A

メラノソームのアクチン線維上の輸送を行う際の、メラノソーム上の荷札として機能します。GTPを結合した活性化型のRab27A分子はメラノソーム上に局在し、ここにSlac2-a（運転手役）・ミオシンVa（運送トラック役）が結合することにより、アクチン線維と呼ばれる道路に沿って細胞膜直下までメラノソームを輸送します（メラノソームのアクチン輸送に関する詳細は下記のURLを参照）。Rab27Aの機能が損なわれているグリセリ症候群患者のメラノサイトでは（*5参照）、メラノソームがアクチン線維に上手く受け渡されず、上記*3の微小管逆行性輸送によりメラノソームが核周辺へと押し戻され、メラノソーム凝集の症状を示します。本研究で用いたRab27A(Q78L)変異体は78番目のグルタミンがロイシンに置換しており、GTPアーゼの活性が無いことが知られています。

プレスリリース（2004年11月15日）

『メラニン色素』の輸送メカニズムを解明 - 肌や髪の毛が黒くなる仕組み-
(http://www.riken.jp/~media/riken/pr/press/2004/20041115_1/20041115_1.pdf)

* 5 グリセリ (Griscelli) 症候群

上記*4に記載のメラノソームのアクチン輸送に関わる分子、Rab27A、Slac2-a、ミオシン Vaのいずれかを遺伝的に欠損すると、毛髪の色化を特徴とするグリセリ症候群（タイプ I～III型）を発症します。いずれもメラノサイトにおいて、メラノソームの輸送障害による核周辺でのメラノソーム凝集という共通の症状を示します。

【論文題目】

Ishida, M., Arai, S. P., Ohbayashi, N. & Fukuda, M. (2014) The GTPase-deficient Rab27A(Q78L) mutant inhibits melanosome transport in melanocytes through trapping of Slac2-a/melanophilin in their cytosol: Development of a novel melanosome-targeting tag *J. Biol. Chem.*, in press (DOI: 10.1074/jbc.M114.552281)

「GTPアーゼ活性を欠損したRab27A(Q78L)変異体は細胞質基質中でSlac2-aをトラップすることによりメラノソームの輸送を阻害する：新規メラノソームターゲティングタグの開発」

(お問い合わせ先)

東北大学大学院生命科学研究科

教授 福田 光則 (ふくだ みつなり)

電話番号： 022-795-7731 (or 022-795-3641)

Eメール： nori@m.tohoku.ac.jp