

ノックアウト解析により加速する低分子量Gタンパク質Rabの生理機能の解明

本間 悠太, 福田 光則

1. はじめに

Rabは、Rasスーパーファミリーに属する低分子量Gタンパク質であり、哺乳類には約60種類のRab遺伝子が存在する。Rab活性化因子の働きによりGTPと結合した活性型Rabは、C末端の脂質化修飾部位を介してさまざまなオルガネラ膜に局在し、特異的な結合タンパク質（エフェクター）をリクルートすることで機能する。これまでの研究により、多くのRabがモータータンパク質や膜繫留因子などと結合し、細胞内小胞輸送に関与することが明らかとなっているが、いまだに機能解析が進んでいないRabも多く残されており、包括的な理解には至っていなかった¹⁾。特に、Rabは小胞輸送の各ステップの時空間的な制御を担っているため、細胞全体のシグナル伝達を調節するRasなどと比べて、恒常活性型・恒常不活性型などの変異体を強制発現させた際の影響は複雑である。また、siRNAなどを用いたノックダウン実験も、オフターゲット効果やノックダウン効率の不十分さによって解釈が難しくなることがしばしばあった。そのような中、近年のゲノム編集技術の革新により、個体レベル・細胞レベル両方においてノックアウト（knockout：KO）による明確な表現型を得ることが容易になったため、Rabの機能解析も急速に進んでいる。そこで本稿では、KO解析により明らかとなったRabの生理機能に関する最近の知見を概説するとともに、筆者らが最近樹立した、網羅的なRabのKO細胞コレクションについて紹介する。

2. 個体レベルでのRabの機能

1) Rab8A・Rab8B

単層上皮細胞は、体外環境に面する頂端膜と、体内環境に面する側底膜という二つの異なる細胞膜領域を有する。Rab8は当初、恒常活性型変異体を用いた実験などから、上皮細胞の側底膜へ向けた極性輸送を制御すると考えられていた。しかし後にRab8A KOマウスが作製され、小腸において頂端膜タンパク質の局在異常（微絨毛封入体病に類似した表現型）を示したことから、Rab8はむしろ頂端膜への輸送に必要であることが明らかとなった²⁾。さらに、Rab8Bの単独KOマウスは有意な表現型を示さなかったが、Rab8A/B KOマウスはRab8A KOマウスよりも早い時期に頂端膜タンパク質の局在異常を示したことから、Rab8A/Bは冗長的に頂端膜への極性輸送を制御すると考えられた³⁾。一方で、培養細胞においてRab8は一次絨毛（シリア）の形成に必要であると報告されていたにもかかわらず、Rab8A/B KOマウスではどの組織においても絨毛の異常は認められなかった。また、頂端膜タンパク質の局在異常についても、小腸以外の組織やMDCK細胞（後述）などでは観察されないことを考慮すると、上皮細胞の極性輸送にはRab8以外の他のRabの関与も予想される。今後、Rab8の近縁分子（Rab10やRab13など）も含めたさらなる解析が待たれる。

2) Rab32・Rab38

リソソームに類似した性質を持ちながら細胞ごとに特化した機能を持つオルガネラを総称して、リソソーム関連オルガネラ（lysosome-related organelle：LRO）と呼ぶ。たとえば、皮膚などの暗色化を担うメラノソーム、止血を促進する血小板濃染顆粒、肺サーファクタントを含有するII型肺胞上皮細胞のラメラ体などがLROに含まれ、これらの形成不全は、眼・皮膚の脱色、出血傾向、肺線維症などを特徴とするヘルマンスキー・パドラック症候群（Hermansky-Pudlak syndrome：HPS）を引き起こす。パラログであるRab32とRab38のダブルKOマウスが、HPSに典型的な症状を示すことが最近報告された⁴⁾。以前より、HPSの原因遺伝子産物であるHPS1とHPS4は複合体を形成し、Rab32/38を活性化することが知られていたため、

東北大学大学院生命科学研究科膜輸送機構解析分野（〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3）

Physiological roles of Rab GTPases as revealed by knockout analyses

Yuta Homma and Mitsunori Fukuda (Laboratory of Membrane Trafficking Mechanisms, Department of Integrative Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Aobayama, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920447

© 2020 公益社団法人日本生化学会

表1 Rab KOによる表現型

Rab	KOマウスの異常および関連する疾患		KO細胞の表現型 (MDCK細胞)
	IMPCデータベース	論文による報告	
1A	—	—	致死
1B	—	—	
2A	致死	—	ゴルジ体の断片化
2B	—	—	
3A	—	3A/B/C/D KOは生後致死	—
3B	—		
3C	異常なし		
3D	—		
4A	血液, 心拍	—	—
4B	体脂肪率	—	
5A	血液, 行動	—	増殖停止
5B	行動	—	
5C	致死	—	
6A	—	胎生致死	分泌不全
6B	行動, 体脂肪率	—	
7A (7)	—	胎生致死	リソソーム肥大化
7B (42)	—	—	—
8A	—	生後致死 (微絨毛封入体病)	—
8B	—		
9A	—	—	—
9B	—	—	
10	—	胎生致死	—
11A	致死	胎生致死	複数の管腔を持つシスト
11B	異常なし	知的障害	
12	異常なし	—	—
13	異常なし	胸腺, リンパ節の縮小	—
14	—	—	—
15	行動	—	—
17	異常なし	—	—
18	行動	Warburg Micro 症候群	—
19	血液, 心臓, 眼	—	—
20	異常なし	結核菌への抵抗性低下	—
21	致死	—	—
22A	異常なし	—	—
31 (22B)	—	—	
23	致死	Carpenter 症候群	—
24	体重, 行動, 骨格	—	—
25	—	腫瘍形成促進	—
26	—	急性肺損傷の悪化	—
27A	—	GrisCELLI 症候群	—
27B	睡眠	調節性分泌の異常	
28	—	網膜色素変性	—
29 (7L1)	異常なし	腎臓の変色・肥大化	—
30	—	—	—

表1 続き

Rab	KOマウスの異常および関連する疾患		KO細胞の表現型 (MDCK細胞)
	IMPCデータベース	論文による報告	
32	一部致死	Hermansky-Pudlak 症候群	—
38	—		
33A	—	Dyggve-Melchior-Clausen 症候群	—
33B	—		
34	致死	ヘッジホッグシグナル異常	—
35	致死	—	シストの極性化遅延
36	血液, 頭部, 心臓	—	—
37	—	—	—
39A	血液	クロスプレゼンテーション不全	—
39B	体長, 運動, 皮膚	知的障害・パーキンソン病	—
40B	異常なし	—	—
40C	一部致死	—	—
42 (43)	—	—	—
43 (41)	体長, 血液, 行動	クロスプレゼンテーション不全	—

Rabの番号はNCBIの遺伝子名に従った。ただし発見の経緯や系統関係などの理由により、括弧内の番号が使われることもあるので注意されたい。KOマウスの表現型は、大まかな異常項目と関連が報告されているヒトの疾患をまとめたもので、「—」は作製されていないものあるいは知られていないものを示す。詳細はIMPCウェブサイトや各文献を参照されたい。KO細胞の表現型は文献11にもとづき、「—」は執筆時点で異常が観察されていないものを示す。

Rab32/38 KOマウスの表現型は驚くべきものではなかったが、Rab32またはRab38単独のKOではこのような強い表現型を示さないことから、LRO形成におけるRab32/38の機能はかなり重複していることが明らかとなった。ただし、Rab38の欠失だけでもわずかに毛色が薄くなり、肺の形態に異常がみられることから、色素細胞やII型肺胞上皮細胞においてはRab38が若干優位に機能していると考えられる。一方で、Rab32 KOマウスはサルモネラ菌感染への抵抗性が減少しており、細胞内におけるサルモネラ菌の増殖を抑制できないことが報告されている⁵⁾。この表現型はHPS1/4の変異マウスでも同程度にみられたため、サルモネラ菌の感染防御経路には主としてRab32が機能していると考えられる。このようにRab32/38は全身においてさまざまなLROの形成を制御しているが、組織によって若干の機能分化がみられることがわかった。

3) 国際的KOマウスプロジェクト

2011年に発足した国際マウス表現型解析コンソーシアム (International Mouse Phenotyping Consortium: IMPC) のプロジェクトによって、すでに5800以上の遺伝子についてKOマウスの表現型が解析され、Web上で公開されている (<https://www.mousephenotype.org>)。過去に論文として報告がないRab KOマウスの表現型として、たとえばRab2A, Rab5C, Rab21, Rab40CのKOマウスが致死になることが明らかになっている (表1)。また、Rab34 KOマウスが繊毛

病 (後述) に典型的な症状を示すことが新たに発見された⁶⁾。IMPCは2030年までに残りすべての遺伝子のKOマウスを作製することを計画しており、Rabやその関連分子の個体レベルでの表現型解析もますます加速すると期待される。

3. 細胞レベルでのRabの機能

1) Rab34

ゲノムワイドなsgRNAライブラリーを用いたCRISPR KOスクリーニングによって、NIH3T3細胞におけるヘッジホッグシグナル伝達を制御する遺伝子の探索が行われ、Rab34がヘッジホッグシグナルへの応答に必要であることが明らかとなった⁷⁾。ヘッジホッグシグナルは一次繊毛によって受容されることが知られており、過去に一次繊毛の形成や機能に関わる遺伝子の多くが、繊毛病 (ヘッジホッグシグナル伝達異常による多指症をはじめとした、繊毛機能不全による疾患) の原因遺伝子として同定されている。実際に、Rab34のKO細胞あるいはKOマウスの組織において、一次繊毛の数が減少していたことから⁸⁾、Rab34は一次繊毛形成を介してヘッジホッグシグナルを制御していると考えられ、前述のIMPCによるRab34 KOマウスの報告もこれを裏づけている。

2) Rab10

単球細胞株に対するレジオネラ菌感染に影響する遺伝子のCRISPR KOスクリーニングによって、Rab10のKO細胞において感染への抵抗性が上昇することが示された⁹⁾。レジオネラ菌はRab10 KO細胞に通常どおり侵入できるが、細胞内での増殖が抑制されていた。加えて、野生型細胞ではレジオネラ菌を取り込んだ小胞にRab10がリクルートされることから、レジオネラ菌は細胞内で増殖するためにRab10の機能をハイジャックする必要があると考えられた。実際、レジオネラ菌が持つタンパク質によってRab10がユビキチン化されることが確認されている。また、RABIFと呼ばれるRab10（および近縁のRab8やRab13）のシャペロンとして働く分子もスクリーニングでヒットしており、Rab10と同様の表現型を示したことから、RABIFの働きがRab10の機能に必須であると考えられた。さらに、インスリン依存的なGLUT4の細胞表面への輸送に必要な因子のスクリーニングにおいても、Rab10とRABIFが同定されたことから¹⁰⁾、ゲノムワイドスクリーニングがRabと協調的に働く因子（活性化・不活性化因子、エフェクター、シャペロンなど）を同定するのにも有効であることが示された。

3) Rab KO細胞コレクション

最後に、Rabファミリー遺伝子の詳細な解析を行うために最近当研究室で樹立した、Rab KO細胞コレクションについて紹介する。筆者らは、イヌ腎臓上皮由来のMDCK細胞を用いて、哺乳類が持つすべてのRab遺伝子のKO細胞を作製した¹¹⁾。特に、近縁のRab遺伝子（Rab1A・Rab1Bなど）による機能重複を考慮し、それらをすべて同時にKOしているのが特徴である。ただし作製過程において、Rab1A/B、およびRab5A/B/Cの同時KO株は得られなかったため、siRNAによるノックダウン実験を行ったところ、これらのRabは細胞の生育や生存に必須であることがわかった。残りのRabについてはすべてKO細胞を得ることができたので、免疫染色によって細胞内オルガネラの形態・分布を解析したところ、Rab2 KO細胞はゴルジ体の断片化、Rab7 KO細胞（ここではRab7A KO細胞を指す）はリソソームの肥大化を示した（表1）。これまで、マンノース6-リン酸受容体の制御因子として知られていたRab9のKO細胞は、リソソームの形態に対する影響を示さなかったが、Rab7とRab9を同時にKOすることで、Rab7 KO細胞でみられていたリソソームの肥大化がさらに亢進した。このことから、これまで系統的に別のRabとして分類されていた（パラログではない）Rab7とRab9は、協調的にリソソームの機能を制御していると考えられた。Rab7 KO細胞をさらに詳しく調べたところ、リソソーム酵素の輸送不全によってリソソームの機能が低下しており、

また、細胞内LC3-II量（オートファジーにより分解される分子）を測定することでオートリソソームの成熟が抑制されていることが明らかとなった¹²⁾。しかし興味深いことに、この表現型はアミノ酸飢餓培地によって急速に（30分以内）回復することが見いだされた。さらに、培地に含まれるアミノ酸の中でも、グルタミンの飢餓のみによってこの現象が引き起こされることを突き止め、またそれがmTORC1非依存的であることも明らかとなった。これらの結果から、これまでによく知られていた、ロイシンやアルギニンによるmTORC1依存的な経路とはまったく別の、グルタミンによるリソソーム制御機構が存在することが示唆される。

MDCK細胞は上皮細胞のモデルとして、極性形成や極性輸送の研究によく用いられている。たとえば、MDCK細胞をコラーゲンゲルの中で培養すると、シストと呼ばれる、内腔（頂端膜側）を持った球状の上皮構造を形成する。野生型細胞は通常一つの内腔面を持ったシストを形成するが、Rab11 KO細胞のシストには複数の小さな内腔が異所的に形成されたことから、Rab11は頂端膜へ向けた極性輸送を制御していると考えられた。このような機能は過去にRab11だけでなく、Rab3、Rab8、Rab10、Rab27などでも報告されていたが¹³⁻¹⁵⁾、これらのKO細胞においては内腔の異常が観察されなかったため、パラログを越えた他のRabによる機能代償の可能性などを想定したさらなる解析が必要である。次に、上皮細胞が側底膜側に形成する細胞外基質の層である基底膜の形成を調べるため、基底膜の主要成分であるラミニンの免疫染色を行ったところ、Rab6 KO細胞においてそのシグナルが消失していることを見いだした。続いて、Rab6 KO細胞では培地中に分泌される細胞外基質成分の量が顕著に減少していることを明らかにし、これが基底膜形成不全の原因であると考えた。さらに、Rab6 KOによる分泌の抑制が、細胞外基質成分に限定されたものかどうかを調べるため、細胞外に分泌された総タンパク質を、同位体ラベルによる定量的な質量分析により解析した。その結果、シグナルペプチドを持った典型的な分泌タンパク質は総じて分泌量が減少していることが明らかとなった。また、シグナルペプチドを付加したGFP（モデル分泌タンパク質）の分泌アッセイにおいてもRab6 KO細胞の分泌量が減少したことから、Rab6は分泌タンパク質全般の輸送に必要であると考えられた。続いて、Rab6が分泌経路のどの段階を制御しているかを調べるために、同調的な輸送アッセイを行ったところ、野生型細胞とRab6 KO細胞で、分泌タンパク質が小胞体からゴルジ体に移行する時間と、ゴルジ体から抜け出る時間には差がみられなかった。したがって、Rab6 KO細胞においても分泌タンパク質は正常にゴルジ体から出芽していると考えられるが、一方で、それらは細胞外には分泌されていないはずである。そ

ここで、分泌されるべきタンパク質がリソソームで分解されてしまっている可能性を考え、Rab6 KO細胞をリソソームの機能阻害剤で処理したところ、分泌タンパク質が顕著にリソソームに蓄積する現象が観察された。したがって、Rab6 KO細胞において細胞膜へ運ばれなかったポストゴルジ小胞は、リソソームへミスターゲットされてしまうと考えられた。このように、筆者らが作製したRab KO細胞は、普遍的な細胞内小胞輸送メカニズムの解明に加えて、上皮細胞に特有の細胞機能のアッセイにも有用であり、今後さらにさまざまな解析を行っていきたいと考えている。また、これらの細胞株は理研バイオリソースセンターより入手可能（カタログ番号：CB5099-RCB5148）であるため、興味のある方にはぜひご活用いただきたい。

4. おわりに

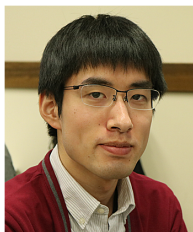
本稿では、KO解析により進展した最近のRab研究について紹介した。Rabは酵母からヒトまで進化的に保存された、普遍的な小胞輸送制御因子であるが、酵母では11種類存在するのに対してヒトでは60種類以上と、多細胞化と生命機能の複雑化に伴って遺伝子数が非常に増加している。このようなRabの役割を知るためには、KOマウスなど個体レベルでの表現型解析が欠かせない。一方で、細胞レベルでの機能解析においても、KO細胞により完全な機能欠失の表現型を検証するのはもはや標準となりつつあり、スクリーニング手法の進化によってますます多くのRabやその関連因子の機能が発見されると思われる。また、近縁のRab間での機能的関連（機能代償など）を考慮すると、筆者らが樹立したKO細胞コレクションのような、Rabに焦点を当てた詳細な解析も必要である。今後このようなKO解析の進歩によって、すべてのRab遺伝子の機能が記述されるのもそう遠くないと期待する。

文 献

- 1) 福田光則 (2007) Rabファミリータンパク質による膜輸送制御の特異性と多様性, 生化学, **79**, 1046–1051.
- 2) Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., et al. (2007) The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature*, **448**, 366–369.
- 3) Sato, T., Iwano, T., Kunii, M., Matsuda, S., Mizuguchi, R., Jung, Y., Hagiwara, H., Yoshihara, Y., Yuzaki, M., Harada, R., et al. (2014) Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *J. Cell Sci.*, **127**, 422–431.
- 4) Aguilar, A., Weber, J., Boscher, J., Freund, M., Ziesel, C., Eckly, A., Magnenat, S., Bourdon, C., Hechler, B., Mangin, P.H., et al. (2019) Combined deficiency of RAB32 and RAB38 in the mouse mimics Hermansky-Pudlak syndrome and critically impairs thrombosis. *Blood Adv.*, **3**, 2368–2380.
- 5) Spanò, S., Gao, X., Hannemann, S., Lara-Tejero, M., & Galán, J.E. (2016) A bacterial pathogen targets a host Rab-family GTPase defense pathway with a GAP. *Cell Host Microbe*, **19**, 216–226.
- 6) Dickinson, M.E., Flenniken, A.M., Ji, X., Teboul, L., Wong, M.D., White, J.K., Meehan, T.F., Weninger, W.J., Westerberg, H., Adissu, H., et al. (2016) High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature*, **537**, 508–514.
- 7) Pusapati, G.V., Kong, J.H., Patel, B.B., Krishnan, A., Sagner, A., Kinnebrew, M., Briscoe, J., Aravind, L., & Rohatgi, R. (2018) CRISPR screens uncover genes that regulate target cell sensitivity to the morphogen Sonic Hedgehog. *Dev. Cell*, **44**, 113–129.
- 8) Xu, S., Liu, Y., Meng, Q., & Wang, B. (2018) Rab34 small GTPase is required for Hedgehog signaling and an early step of ciliary vesicle formation in mouse. *J. Cell Sci.*, **131**, jcs213710.
- 9) Jeng, E.E., Bhadkamkar, V., Ibe, N.U., Gause, H., Jiang, L., Chan, J., Jian, R., Jimenez-Morales, D., Stevenson, E., Krogan, N.J., et al. (2019) Systematic identification of host cell regulators of *Legionella pneumophila* pathogenesis using a genome-wide CRISPR screen. *Cell Host Microbe*, **26**, 551–563.
- 10) Gulbranson, D.R., Davis, E.M., Demmitt, B.A., Ouyang, Y., Ye, Y., Yu, H., & Shen, J. (2017) RABIF/MSS4 is a Rab-stabilizing holdase chaperone required for GLUT4 exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E8224–E8233.
- 11) Homma, Y., Kinoshita, R., Kuchitsu, Y., Wawro, P.S., Marubashi, S., Oguchi, M.E., Ishida, M., Fujita, N., & Fukuda, M. (2019) Comprehensive knockout analysis of the Rab family GTPases in epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **218**, 2035–2050.
- 12) Kuchitsu, Y., Homma, Y., Fujita, N., & Fukuda, M. (2018) Rab7 knockout unveils regulated autolysosome maturation induced by glutamine starvation. *J. Cell Sci.*, **131**, jcs215442.
- 13) Bryant, D.M., Datta, A., Rodríguez-Fraticelli, A.E., Peränen, J., Martín-Belmonte, F., & Mostov, K.E. (2010) A molecular network for *de novo* generation of the apical surface and lumen. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 1035–1045.
- 14) Gálvez-Santisteban, M., Rodríguez-Fraticelli, A.E., Bryant, D.M., Vergarauregui, S., Yasuda, T., Bañón-Rodríguez, I., Bernascone, I., Datta, A., Spivak, N., Young, K., et al. (2012) Synaptotagmin-like proteins control the formation of a single apical membrane domain in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.*, **14**, 838–849.
- 15) Mrozowska, P.S., & Fukuda, M. (2016) Regulation of podocalyxin trafficking by Rab small GTPases in 2D and 3D epithelial cell cultures. *J. Cell Biol.*, **213**, 355–369.

著者寸描

●本間 悠太 (ほんま ゆうた)



東北大学大学院生命科学研究科助教。博士 (生命科学)。

■略歴 2012年3月東北大学理学部生物学科卒業, 14年3月同大学院生命科学研究科修士課程修了, 17年3月同博士課程修了, 同年4月日本学術振興会特別研究員 (PD), 18年4月より現職。

■研究テーマと抱負 メンブレントラフィックを中心に, 新しい現象や遺伝子機能を発見したい。

■ウェブサイト http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/fukuda_lab/home-ja.html。

■趣味 アウトドア, 野鳥観察。

●福田 光則 (ふくだ みつのり)

東北大学大学院生命科学研究科教授。

■ウェブサイト <https://www.lifesci.tohoku.ac.jp/research/teacher/detail---id-1724.html> その他については本誌79巻11号 (2007), p.1073をご参照ください。