

# メラニン合成酵素を輸送する Rab32 および Rab38 の不活性化因子 GAP の色素細胞における機能解析

筑波大学医学医療系生理化学

大林 典彦

Rab32 and Rab38 (Rab32/Rab38) have been proposed as regulating the trafficking of melanogenic enzymes, including tyrosinase and tyrosinase-related protein 1 (Tyrp1), to melanosomes in melanocytes. Rab32/Rab38 are known to function as switch molecules that cycle between a GDP-bound inactive form and a GTP-bound active form; the cycle is thought to be regulated by an activating enzyme, guanine nucleotide exchange factor (GEF), and an inactivating enzyme, GTPase-activating protein (GAP), which stimulates the GTPase activity of Rab32/Rab38. Although BLOC-3 has already been identified as a Rab32/Rab38-specific GEF that regulates the trafficking of tyrosinase and Tyrp1, physiological GAP for Rab32/Rab38 in melanocytes has never been identified, and it has remained unclear whether Rab32/Rab38 are involved in the trafficking of dopachrome tautomerase (Dct), another melanogenic enzyme, in melanocytes. In this study, we investigated RUTBC1, which was originally characterized as a Rab9-binding protein and GAP for Rab32 and Rab33B *in vitro*, and the results demonstrated that RUTBC1 functions as a physiological GAP for Rab32/Rab38 in the trafficking of all three melanogenic enzymes in melanocytes. The results of this study also demonstrated the involvement of Rab9A in the regulation of the RUTBC1 localization and in the trafficking of all three melanogenic enzymes. We discovered that either excess activation or inactivation of Rab32/Rab38 achieved by manipulating RUTBC1 inhibits the trafficking of all three melanogenic enzymes. These results collectively indicate that proper spatiotemporal regulation of Rab32/Rab38 is essential for the normal trafficking of all three melanogenic enzymes in melanocytes.

## 1. 緒言

メラニン合成酵素は色素細胞において生合成された後、トランスゴルジ網からエンドソームを経てメラノソームに輸送される。そして、輸送されたメラニン合成酵素の働きによりメラノソームでメラニンが産生・貯留される。このメラニン合成酵素の輸送過程に異常をきたす疾患の1つとして、白皮症を呈するヘルマンズキー・パドラック症候群 (HPS) が知られている。HPS様の病態を呈するモデル動物はいくつか報告されているが、その中でも、*chocolate* マウスや *ruby* ラットは Rab38 が責任遺伝子である<sup>1)</sup>。Rab は低分子量 G タンパク質の1つで、GTP 結合型の活性化体と GDP 結合型の不活性化体をサイクルすることで、その機能を発揮する。Rab38 は一次構造が類似した Rab32 と冗長的にメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を調節している<sup>2)</sup>。近年、HPS の原因因子の1つである biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) と呼ばれる HPS1 と HPS4 分子から構成される複合体が、Rab32 および Rab38 (以下、Rab32/Rab38) の GEF (Guanine nucleotide exchange factor) として機能し、Rab32/Rab38 を活性化することが報告されている<sup>3)</sup>。一

方で、色素細胞において実際に Rab32/Rab38 を不活性化する GAP (GTPase-activating factor) については謎に包まれており、Rab32/Rab38 の調節機構については十分には理解されていなかった。そこで、本研究では *in vitro* で Rab32 と Rab33B (Rab38 とは異なるアイソフォーム) に対して GAP 活性を有することが報告された Run and TBC domain-containing 1 分子 (RUTBC1、SGSM2 としても知られる) に着目し<sup>4)</sup>、色素細胞における RUTBC1 の機能を解析し、メラニン合成酵素輸送における Rab32/Rab38 の制御機構を精緻に理解することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 試薬類

Rab32、Rab38、チロシナーゼ、Tyrp1、Dct に対する抗体は、精製した各タンパク質あるいはペプチドをウサギに免疫することにより得た。活性化型 Rab32/Rab38 に特異的に結合する VPS9-ankyrin repeat protein (Varp) の単離は既に行っており、これを用いた<sup>5)</sup>。ヒト RUTBC1 cDNA は、かずさ DNA 研究所 (千葉、日本) より得た。マウス RUTBC1 に対する2種類の siRNA は、ニッポンジーン (富山、日本) より得た。

### 2.2. 細胞蛍光免疫染色

マウス由来の色素細胞株 melan-a 細胞は、Dorothy C. Bennett 教授から提供された。各種発現ベクターや siRNA は、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて melan-a 細胞に導入した。染色された細胞を共焦点蛍光顕微鏡 (FluoView 1000-D、オリンパス、東京、日本) により観察



Functional analysis of a GAP for Rab32/Rab38 that regulate melanogenic enzymes trafficking in melanocytes

Norihiko Ohbayashi

Department of Physiological Chemistry,  
Faculty of Medicine, University of  
Tsukuba

した。共焦点顕微鏡で無作為に 20 細胞ずつ蛍光シグナルを取得し、MetaMorph ソフトウェア (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) で定量した。ダネット検定またはスチューデント t 検定を用いて統計解析を行い、 $p$  値  $< 0.05$  を統計学的に有意とみなした。

### 2. 3. 共免疫沈降とブルダウンアッセイ

Lipofectamine-LTX Plus (Invitrogen) を用いて T7-GST-Varp または T7-GST 発現プラスミドを COS-7 細胞に導入した。可溶化バッファー (50mM HEPES-KOH pH7.2, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤 (Roche)) を用いて細胞を溶解し、細胞溶解物をグルタチオンセファロースビーズと共に 4℃ で 2 時間インキュベートした。ビーズを洗浄バッファー (50mM HEPES-KOH pH7.2, 150mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2% Triton X-100) で 3 回洗浄し、Varp ビーズを調製した。次に、T7-RUTBC1 野生型 (WT) / R803A および FLAG-Rab32 / Rab38 を共発現した COS-7 細胞抽出物と Varp ビーズを反応させ、FLAG-Rab32 / Rab38 の活性化レベルを定量した。

T7-Varp 発現プラスミドをトランスフェクションした COS-7 細胞抽出物を可溶化バッファーで溶解し、抗 T7 タグ抗体結合アガロースビーズと 4℃ で 2 時間反応させた。ビーズを洗浄バッファーで 3 回洗浄し、次いで RUTBC1 ノックダウン melan-a 細胞の可溶化物と共に 4℃ で 2 時間インキュベートした。そして、ビーズに結合した内在性 Rab32 / Rab38 タンパク質をイムノブロットで定量し、内

在性 Rab32 / Rab38 の活性化レベルを評価した。

## 3. 結果

### 3. 1. RUTBC1 はメラニン合成酵素の輸送に関わる

RUTBC1 の機能を解析するため、RUTBC1 を色素細胞に過剰発現させたところ、チロシナーゼ、Tyrp1、Dct すべてのメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送が阻害され、それらの色素細胞における発現が大幅に低下した (図 2)。Rab32 と Rab38 がともに不活性化したときに、これらメラニン合成酵素の輸送が阻害されることから<sup>2)</sup>、RUTBC1 が色素細胞内で Rab32 / Rab38 に対する GAP として機能する可能性が示唆された。

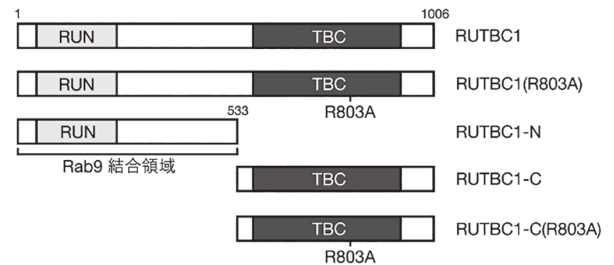


図1 本研究で用いたヒト RUTBC1 およびその変異体 (RUTBC1-N, RUTBC1-C, および R803A 変異体) の模式図。

RUTBC1 は、Rab9 結合活性を有する N 末端 RUN ドメイン (薄灰色のボックス) および、*in vitro* で Rab32 および Rab38 に対して GAP 活性を示す C 末端 TBC ドメイン (暗灰色のボックス) を有している。

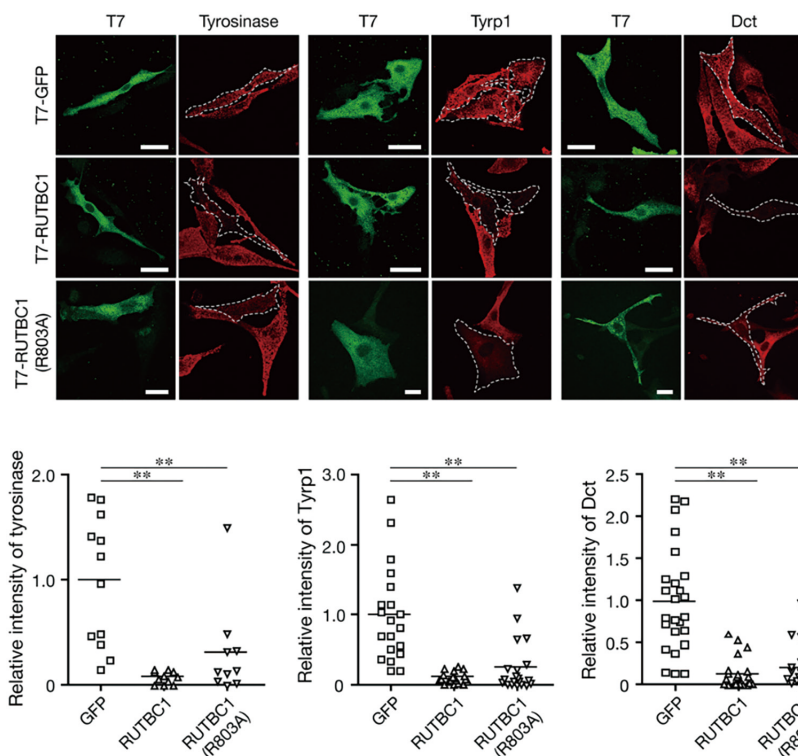


図2 色素細胞におけるメラニン合成酵素のメラノソーム局在に対する RUTBC1 の過剰発現の影響。

上図は、T7-RUTBC1、T7-RUTBC1 (R803A)、そしてコントロールとして T7-GFP を発現する色素細胞の画像を示す。Melan-a 細胞に T7 タグを付加した各タンパク質発現プラスミドをトランスフェクションし、チロシナーゼ、Tyrp1、Dct に対する抗体で染色した。T7 タグタンパク質を発現する細胞は、破線で示されている。スケールバー: 20 μm。

下図は、上図で示されたチロシナーゼ / Tyrp1 / Dct シグナルを定量化したグラフである。バーは 20 細胞におけるシグナルの平均値を示している。

### 3. 2. RUTBC1 のTBCドメインはメラニン合成酵素の輸送に関わるが、TBCドメイン以外もメラニン合成酵素の輸送に必要である

メラニン合成酵素の輸送阻害がRUTBC1におけるTBCドメインのGAP活性によるものかどうかを確認するため、N末端側のRUNドメインを欠いたRUTBC1-CおよびTBCドメインの活性中心に点変異を導入したRUTBC1-C (R803A)を作製した(図1)。RUTBC1-Cの発現により、チロシナーゼ、Tyrp1、Dctすべてのメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を阻害されたが、RUTBC1-C (R803A)の発現ではほとんど影響が認められなかった(図3)。これらの結果から、RUTBC1-Cによるメラニン合成酵素の阻害は、RUTBC1の基質となるRabの強制的な不活性化による可能性が高いと考えられた。しかしながら、予期せぬことに、全長のRUTBC1 (R803A)変異体を過剰発現させても、すべてのメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送の阻害が観察されたことから(図2)、TBCドメインによるGAP活性に依存しない、すなわちRUTBC1のN末端側の作用によって仲介される何らかの分子メカニズムの存在が想定された。

### 3. 3. RUTBC1はRab32とRab38に対してGAP活性を有する

RUTBC1によるRabの不活性化機構を明らかにするため、Rab32/Rab38をRUTBC1あるいはRUTBC1 (R803A)変異体と共発現させ、その細胞抽出液よりVarp分子を用

いて活性化型Rab32/Rab38をブルダウンした。その結果、RUTBC1 (R803A)変異体はRab32/Rab38を不活性化できないのに対し、RUTBC1分子は顕著にRab32/Rab38を不活性化することを明らかにした(図4)。

一方、色素細胞からRUTBC1をノックダウンし、その細胞可溶液を用いて同様に活性化型Rab32/Rab38を定量したところ、細胞内のRab32/Rab38の発現量自体は変化が認められないものの、活性化型Rab32/Rab38の量がコントロールに比べて顕著に増加することを見出した(図5)。さらに細胞免疫染色により、RUTBC1ノックダウン色素細胞では、メラノソーム上のRab32/Rab38シグナルがより増強する結果を得た(図5)。これはRUTBC1ノックダウン色素細胞においてRab32/Rab38が過剰に活性化され、メラノソーム膜に持続的に局在することを示唆している。

### 3. 4. Rab32とRab38の過剰な活性化は、メラニン合成酵素の輸送を阻害する

Rab32/Rab38はメラニン合成酵素輸送を促進することが知られており<sup>2)</sup>、RUTBC1ノックダウン色素細胞においてRab32/Rab38が活性化したこと、RUTBC1ノックダウン色素細胞ではメラニン合成酵素輸送が促進されるものと予想した。しかしながら、RUTBC1ノックダウン色素細胞を用いてメラニン合成酵素の細胞内局在や発現量を評価したところ、メラニン合成酵素輸送が顕著に抑制されるという全く相反する結果を得るに至った(図6)。

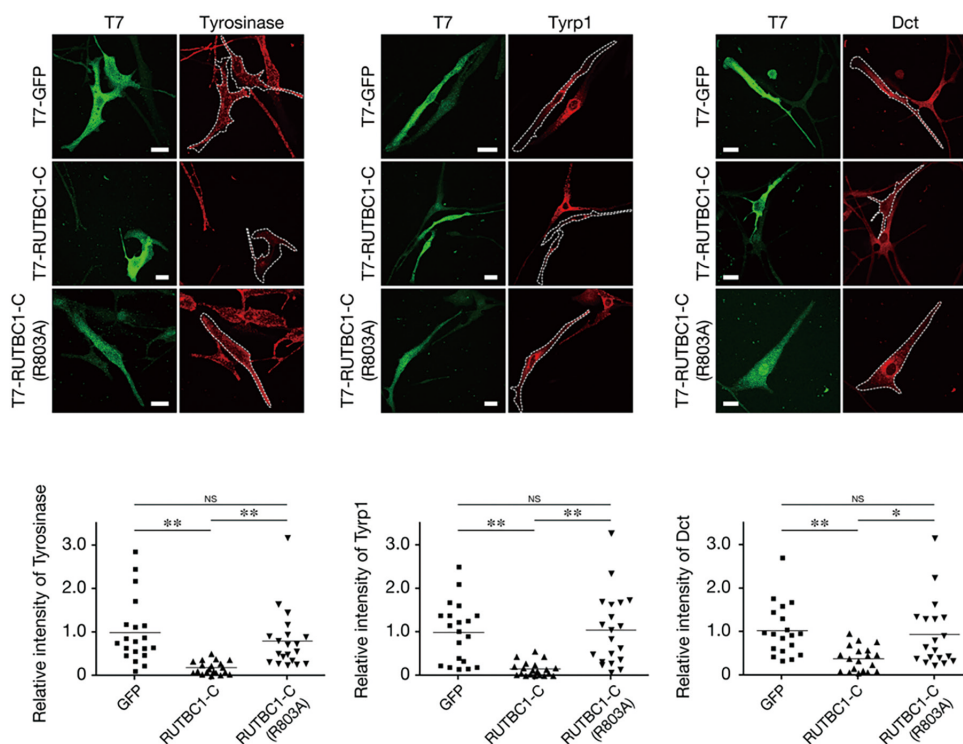


図3 RUTBC1のC末端TBCドメインのGAP活性は、色素細胞におけるチロシナーゼ/Tyrp1/Dct輸送に関与する。

T7-GFP、T7-RUTBC1-C、またはT7-RUTBC1-C (R803A)を発現する色素細胞の画像を示す。Melan-a細胞にT7タグを付加した各タンパク質発現プラスミドをトランスフェクションし、チロシナーゼ、Tyrp1、Dctに対する抗体で染色した。T7タグタンパク質を発現する細胞は、破線で示されている。下図は、上図で示されたチロシナーゼ/Tyrp1/Dctシグナルを定量化したグラフである。バーは、20細胞シグナルの平均値を示している。

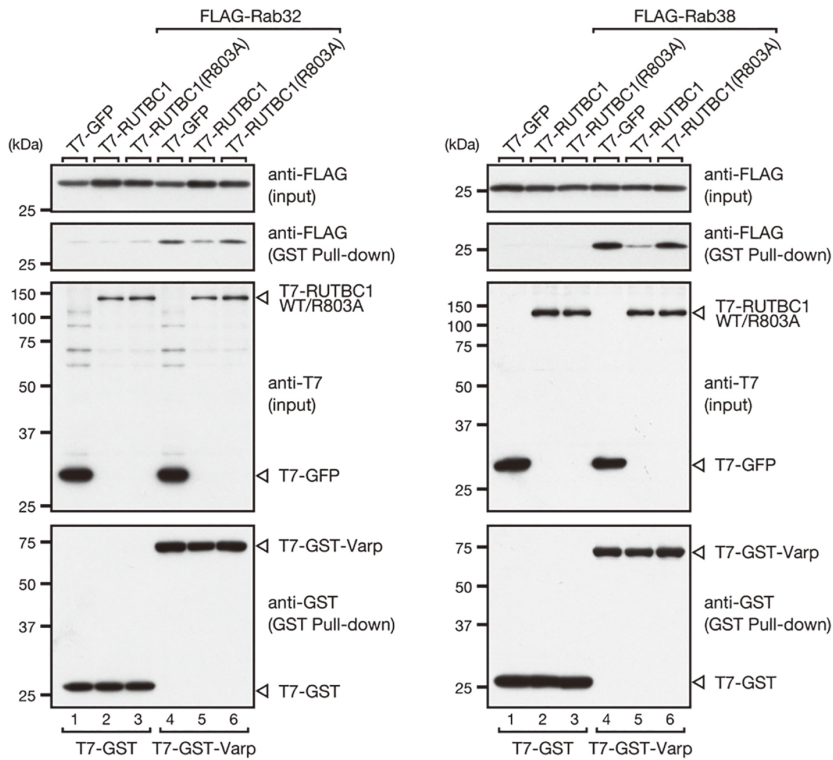


図 4 RUTBC1 は、細胞内で Rab32 および Rab38 の両方を不活性化する。

T7-GFP、T7-RUTBC1 または T7-RUTBC1 (R803A) とともに FLAG-Rab32 あるいは FLAG-Rab38 を発現する COS-7 細胞を可溶化し、Rab32/Rab38 エフェクターである Varp を結合したグルタチオンセファロースビーズを用いて活性化型 Rab32 および Rab38 をプルダウンした。

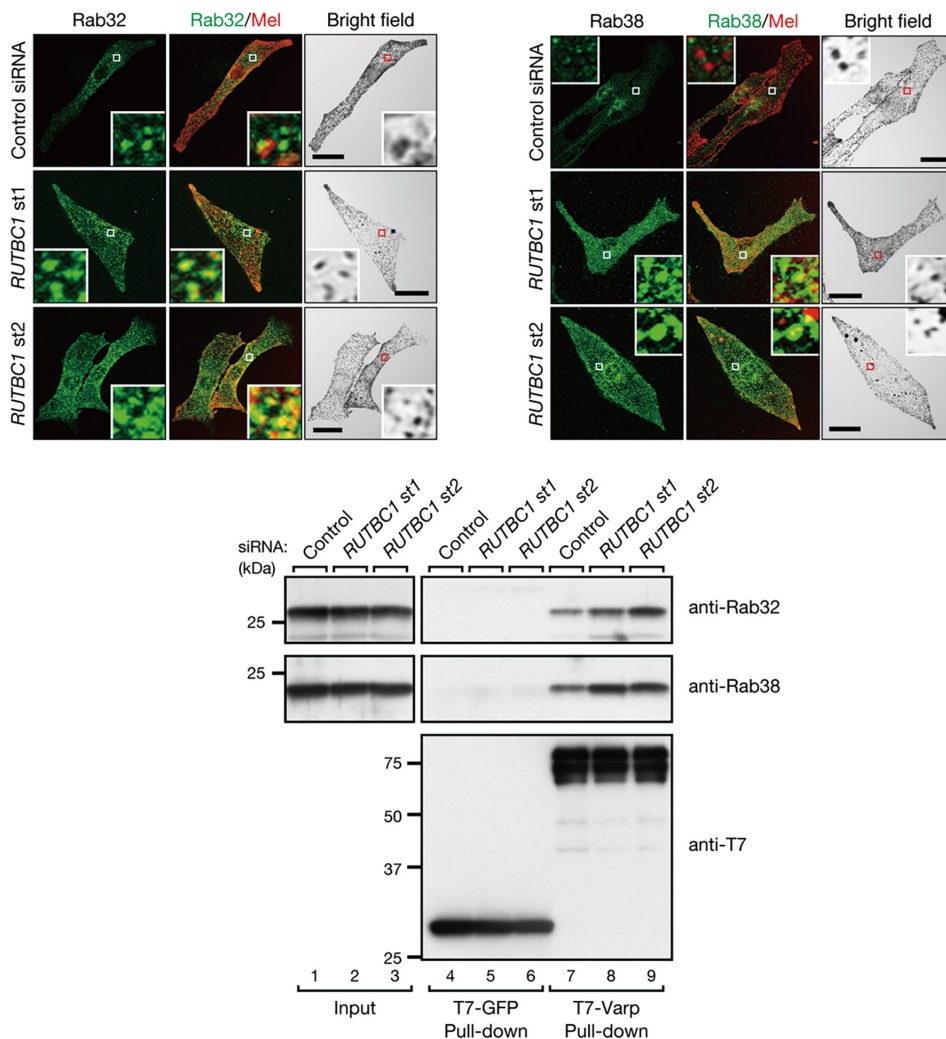


図 5 RUTBC1 ノックダウンは、Rab32 / Rab38 のメラノソーム発現を増加させる。

抗 Rab32 抗体 (左上図) または抗 Rab38 抗体 (右上図) で染色された RUTBC1 ノックダウン色素細胞の典型的な画像およびそれらに対応する明視野画像を示す。挿入図は、ボックス領域の拡大図を示す。メラノソームにおける Rab32 / Rab38 陽性シグナルは、コントロール siRNA 処理色素細胞においてメラノソーム (Mel、擬似赤色) と共局在しており、そのシグナルは RUTBC1 ノックダウン色素細胞において明らかに増加した。(下図) T7-GFP または T7-Varp と結合した抗 T7 タグ抗体結合アガロースビーズを、RUTBC1 ノックダウン色素細胞の可溶化液とともにインキュベートした。免疫沈降した T7-GFP または T7-Varp および共免疫沈降した内在性 Rab32 / Rab38 が、示された抗体によるウェスタンブロットにより検出された。

### 3. 5. Rab9Aはメラニン合成酵素の輸送に関与する

GAP活性を欠損した全長RUTBC1 (R803A) 変異体の過剰発現の結果として、メラニン合成酵素の輸送が阻害された分子基盤の解明を試みた。C末端側のRUTBC1-C (R803A) 変異体は阻害活性を示さなかったことから、RUNドメインを含むRUTBC1のN末端側領域が、メラニン合成酵素の輸送に付加的な機能を果たしている可能性が考えられた。興味深いことに、RUTBC1はRab9エフェクターとして同定されており<sup>4)</sup> (図1)、RUTBC1のN末端側領域はRab9結合に重要な役割を果たすことが報告されている。色素細胞では、Rab9Aアイソフォームのみを発現し、Rab9Bアイソフォームを発現しないことから (データ未掲載)、RUTBC1と共にRab9Aを色素細胞に発現させた。その結果、Rab9AおよびRUTBC1 (WT / R803A)

はしばしばメラノソームにおいて共局在した (図7)。単独の発現ではRUTBC1の大部分は細胞質全体に散らばったことから (図7)、RUTBC1のメラノソームにおける局在は、Rab9Aによって仲介されると考えられた。興味深いことに、Rab9AとRUTBC1を共発現した色素細胞では、メラニン合成酵素輸送が顕著に阻害されるのに対し、Rab9AとRUTBC1 (R803A) 変異体を共発現した色素細胞では、メラニン合成酵素の輸送に異常は認められなかった (図7)。

最後に、BLOC-3のサブユニットであるHPS4もまたRab9のエフェクター分子であることから<sup>6)</sup>、Rab9AとRUTBC1との機能関係を解析するため、HPS4に焦点を当てて解析を行った。これまでの報告に一致するように、HPS4とRab9Aの結合、および、RUTBC1とRab9Aの結合を確認した (図8)。次いで、競合実験を行うことにより、

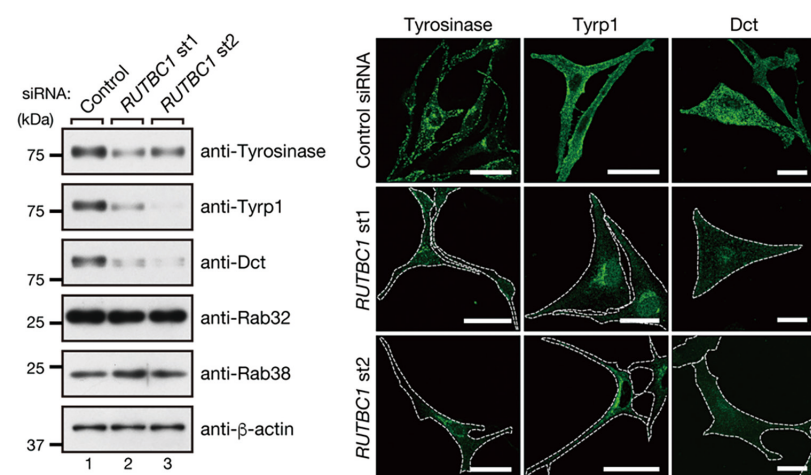


図6 色素細胞におけるRUTBC1のノックダウンは、3つのメラニン合成酵素すべての発現を減少させる。

RUTBC1 ノックダウンは、Rab32 / Rab38の発現を変化させることなく、色素細胞における3つのメラニン合成酵素 (チロシナーゼ、Tyrp1、Dct) 全ての発現を強く抑制した。右図は3つのメラニン合成酵素それぞれに対する抗体を用いて染色されたRUTBC1 ノックダウン色素細胞の画像を示す。破線は細胞膜を示す。

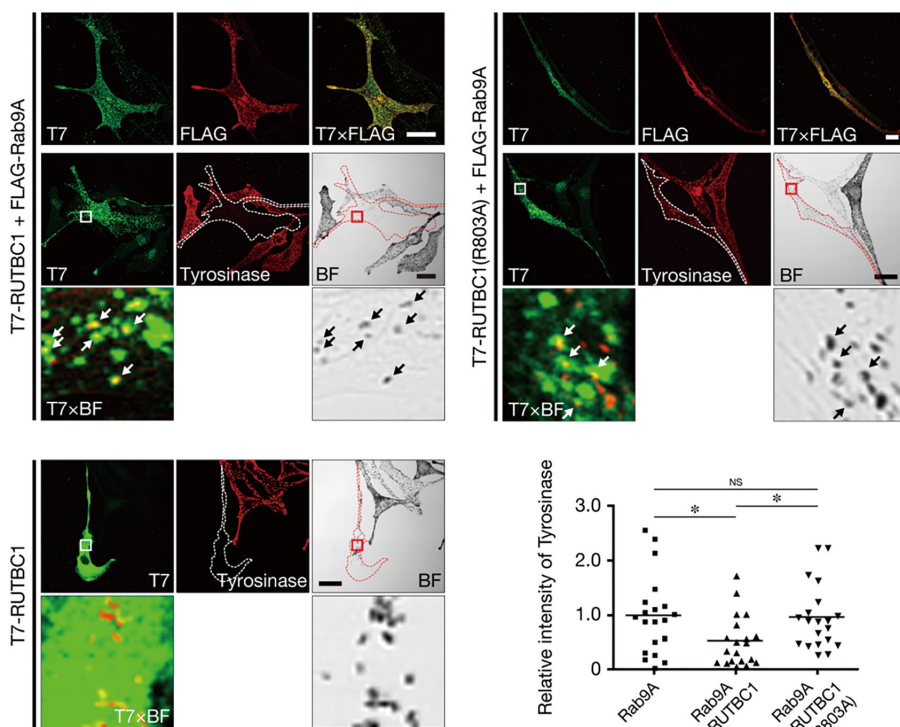


図7 Rab9Aはチロシナーゼのメラノソームへの適切な輸送に関与している。

T7-RUTBC1 または T7-RUTBC1 (R803A) と FLAG-Rab9A を共発現する色素細胞の画像を示す。抗 T7 抗体、抗 FLAG 抗体、抗チロシナーゼ抗体を用いて細胞を染色し、対応する明視野 (BF) 画像を示す。赤色あるいは白色の破線は、T7-RUTBC1 (WT / R803A) または FLAG-Rab9A を発現する細胞を示す。挿入図は、ボックス領域の拡大図を示す。T7-RUTBC1 + FLAG-Rab9A を発現する色素細胞ではチロシナーゼシグナルが減少したが、T7-RUTBC1 (R803A) + FLAG-Rab9A を発現する色素細胞では減少しなかったことに留意されたい。

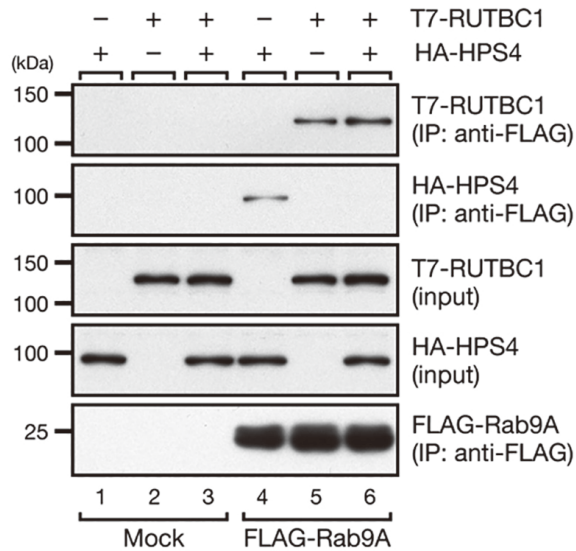


図8 RUTBC1はHPS4と競合してRab9Aと結合する。  
HA-HPS4またはT7-RUTBC1と共にFLAG-Rab9Aを発現したCOS-7細胞溶解液を、抗FLAGタグ抗体結合アガロースビーズで免疫沈降させ、FLAGビーズに結合したタンパク質を示された抗体を用いてイムノブロットした結果を示す。

RUTBC1がHPS4とRab9A間の結合を阻害することを見出した(図8)。これらの結果は、RUTBC1が少なくとも2つの作用、すなわち①TBCドメインを介するRab32/Rab38の直接的な不活性化能、②Rab9AとBLOC-3から構成される複合体形成を阻害することによる間接的なRab32/Rab38の不活性化能を有していることを示している。

#### 4. 考 察

RUTBC1はRab32およびRab33Bに対してGAP活性を有すること、そして*in vitro*ではRab38に対して約10倍低いGAP活性を有することが報告されていたが、その生理機能については不明であった。本研究では、RUTBC1がメラニン合成酵素のメラノソームへの輸送に重要なRab32/Rab38の生理学的なGAPであることを裏づけるいくつかの研究成果を得ることができた。まず、RUTBC1-C末端のTBCドメインを色素細胞に発現させるとメラニン合成酵素の輸送が阻害されるのに対し、その変異体RUTBC-1(R803A)を発現させても何ら影響が認められなかった。第二に、RUTBC1ノックダウン色素細胞では、メラノソーム上のRab32/Rab38シグナルの増強が観察された。第三に、生化学的手法によりRUTBC1が活性化型Rab32および活性化型Rab38の量を劇的に減少させ、一方でRUTBC1ノックダウン色素細胞では活性化型Rab32および活性化型Rab38量の増加が観察された。これらの知見から、RUTBC1が色素細胞におけるRab32/Rab38の機能的なGAPであると結論づけた。

次に、RUTBC1の過剰発現およびノックダウンによりメラニン合成酵素の輸送が阻害されたことから、メラニン合成酵素輸送にはRab32/Rab38の適切な活性化・不活性化のサイクル(すなわちGTP-GDPサイクル)が必要であると考えられた。

予期しなかった別の発見として、全長RUTBC1のGAP活性変異体であるRUTBC1(R803A)の過剰発現もまた、野生型RUTBC1の過剰発現と同じく、メラニン合成酵素すべての輸送異常を引き起こしたことがあげられる。C末端のRUTBC1-C(R803A)変異体は全く効果がなかったことから、RUTBC1のN末端領域の重要性が示唆された。

RUTBC1のN末端領域は、Rab9と相互作用するため、RUTBC1(R803A)変異体による阻害効果は、色素細胞における内在性Rab9Aを捕捉することにより、内在性Rab9Aと内在性RUTBC1の相互作用を抑制した可能性が考えられる。RUTBC1(R803A)変異体をRab9Aと共に過剰発現した際には、メラニン合成酵素の輸送阻害は認められなかったという結果は、この可能性を裏づけていると考えられる。さらに本研究では、RUTBC1がRab9AとBLOC-3のサブユニットであるHPS4との相互作用を阻害することを示した。したがって、RUTBC1過剰発現は、Rab32/Rab38のGAP活性を促進することによる直接的な阻害、さらに、Rab9AとBLOC-3の相互作用を阻害することによりRab32/Rab38の活性化を間接的に阻害する、というモデルを提唱するに至った<sup>7)</sup>。

#### 5. 総 括

本研究では、Rab9結合タンパク質であるRUTBC1がRab32/Rab38を不活性化することにより色素細胞における3つのメラニン合成酵素の輸送を抑制すること、また、RUTBC1ノックダウンにより、メラニン合成酵素の輸送が抑制されることを明らかにした。これらの発見により、メラノソームへのメラニン合成酵素の輸送が正常に行われるためには、Rab32/Rab38の適切なGTP-GDPサイクルが必要であることが示唆された。

Rab32/Rab38の活性化レベルを制御することは、メラノソームの成熟(暗色化)の制御につながるため、Rab32/Rab38の活性化制御は重要な創薬のターゲットと考えることができる。しかし、低分子量Gタンパク質には化合物が相互作用できるポケットが極めて少なく、低分子量Gタンパク質自身をターゲットとした新薬の開発は非常に困難であると考えられている。本研究結果をふまえ、Rab32/Rab38とRUTBC1の相互作用を阻害するような化合物の開発は、メラニン合成酵素のメラノソームへの輸送を調節できる可能性が考えられる。本アプローチは、アルブチンをはじめとするメラニン合成酵素自身の活性化制御をターゲットとする既存のアプローチとは異なっている点に特色

があり、メラニン産生を多面的な角度から制御することは、今後のコスメトロジー研究の発展に不可欠であると考えられる。

# (引用文献)

- 1) Oiso N, Riddle SR, Serikawa T, Kuramoto T, Spritz RA: The rat Ruby (*R*) locus is Rab38: identical mutations in Fawn-hooded and Tester-Moriyama rats derived from an ancestral Long Evans rat sub-strain, *Mamm. Genome*, 15, 307-314, 2004.
- 2) Gerondopoulos A, Langemeyer L, Liang JR, Linford A, Barr FA: BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor, *Curr. Biol.*, 20, 2135-2139, 2012.
- 3) Tamura K, Ohbayashi N, Maruta Y, Kanno E, Itoh T, Fukuda M: Varp is a novel Rab32/38-binding protein that regulates Tyrp1 trafficking in melanocytes, *Mol. Biol. Cell*, 20, 2900-2908, 2009.
- 4) Wasmeier C, Romao M, Plowright L, Bennett DC, Raposo G, Seabra MC: Rab38 and Rab32 control post-Golgi trafficking of melanogenic enzymes, *J. Cell Biol.*, 175, 271-281, 2006.
- 5) Nottingham RM, Ganley IG, Barr FA, Lambright DG, Pfeffer SR: RUTBC1 protein, a Rab9A effector that activates GTP hydrolysis by Rab32 and Rab33B proteins, *J. Biol. Chem.*, 23, 33213-33222, 2011.
- 6) Kloer DP, Rojas R, Ivan V, Moriyama K, van Vlijmen T, Murthy N, Ghirlando R, van der Sluijs P, Hurley JH, Bonifacino JS: Assembly of the biogenesis of lysosome-related organelles complex-3 (BLOC-3) and its interaction with Rab9, *J. Biol. Chem.*, 285, 7794-7804, 2010.
- 7) Marubashi S, Shimada H, Fukuda M, Ohbayashi N: RUTBC1 Functions as a GTPase-activating Protein for Rab32/38 and Regulates Melanogenic Enzyme Trafficking in Melanocytes, *J. Biol. Chem.*, 291, 1427-1440, 2016.