博士論文（要約）

Study on the molecular mechanisms of microtubule-dependent anterograde melanosome transport in melanocytes

（メラノサイトにおけるメラノソームの微小管順行性輸送メカニズムに関する研究）

平成 27 年度

東北大学 大学院生命科学研究科

生命機能科学専攻　膜輸送機構解析分野

石田 森衛 (B4BD2001)

研究背景

メラノソームとはメラニン色素を合成・貯蔵する小胞で、メラノサイトという特殊な細胞で形成される。メラノソームの主要な機能はメラニン色素による紫外線の吸収である。哺乳類の皮膚においてメラノソームは、メラノサイト内を輸送され、周囲のケラチノサイトへ転移される。この輸送が行われないと、メラニン色素が正しく皮膚に沈着せず、紫外線による細胞の核へのダメージを防ぐことができなくなる。つまりメラノソームが機能を発揮するためには、単に形成されるだけでなく、正しく輸送されることが必要なのである。では次にメラノサイト内で、どのようにメラノソームが輸送されるか説明する。メラノソームはメラノサイト内で、微小管とアクチンフィラメントの２種類の細胞内骨格を輸送される。メラノソームはメラノサイトの核周辺で形成後、まず微小管を順方向に輸送され、続いてアクチン上を輸送され細胞の辺縁部へ到達後、ケラチノサイトへ転移される。また、これらの輸送に失敗した場合、メラノソームは微小管逆行性輸送のはたらきにより、核付近まで引き戻される。これまでの研究により、メラノソームのアクチン上の輸送、及び微小管逆行性輸送の分子メカニズムに関しては解明されてきた。しかし微小管順行性輸送の分子メカニズムは、ほとんど明らかになっていなかった。そこで私は当大学院の博士課程において、このメカニズムの解明を試みた。

続いてメラノソームを含む小胞輸送に関わる分子群を二つ紹介する。まず一つは低分子量 G タンパク質 Rab である。Rab とは GDP 結合時の不活性化型と、GTP 結合時の活性化型をサイクルする分子スイッチであり、活性化型で輸送小胞に局在し、エフェクターと呼ばれる結合タンパク質をリクルートすることで、特定の小胞輸送を制御する。哺乳類には約６０種類の Rab が存在し、この豊富な Rab によりさまざまなタイプの小胞輸送が制御されている。もう一つは微小管順行性輸送の制御因子である kinesin である。kinesin は微小管上を順方向に移動するモーター分子であり、個々の遺伝子は kinesin superfamily proteins の略称である、Kif として命名されている。Kif は N 末端の motor domain と C 末端の tail domain から成り立っており、tail domain において異なる分子を介して間接的に、もしくは直接的に小胞と相互作用し、それらの輸送を制御する。Kif に関しても豊富に種類があることが知られ、哺乳類では約４０種類の Kif が報告されている。本研究では Rab と Kif の二種類の分子群に着目し解析を行っている。

本研究の流れを説明する。本研究は「メラノソームの微小管順行性輸送の分子メカニズムの解明」を目的として、以下の三つのセクションに分類される実験を行った。まずセクション１ではメラノソームの微小管順行性輸送に関わる Rab の網羅的スクリーニングを行い、Rab1A を制御分子として同定することに成功した。セクション２では同定した Rab1A が具体的にどのようなメカニズムでメラノソームの微小管順行性輸送を制御しているか調べ、Rab1A が SKIP 及び Kif5b によって構成される kinesin-1 と複合体を形成することで、メラノソームの微小管順行性輸送を制御していることを明らかにした。セクション３では Kif5b 以外にメラノソーム輸送の制御に関わる kinesin 分子の存在を想定し、メラノソームに局在する Kif 分子のスクリーニングを行った。その結果新たな Kif 分子を制御因子として同定することに成功した。

研究結果

セクション１　メラノソームの微小管順行性輸送に関わる Rab の網羅的スクリーニング

まず、メラノソームの微小管順行性輸送に関わる Rab の同定を試みた。スクリーニングを計画するに当たって、メラノソームのアクチン輸送を制御する Rab27A の欠損によりメラノソームが核周辺に凝集する知見を参考にした。これはアクチン輸送が欠損することにより、メラノソームが微小管逆行性輸送依存的に核周辺まで引き戻されることで誘導されると考えられている。そこで私は微小管順行性輸送の欠損によっても、メラノソームの核周辺への凝集が誘導されると仮説をたてスクリーニングを行った。

１次スクリーニングとして、Rab の常時不活性化型及び、活性化型変異体に着目した。これらの変異体は細胞に過剰発現させることで、その Rab が制御する特定の膜輸送ステップを促進または阻害することが知られており、Rab の機能解析において、頻繁に用いられる手法である。そこで６０種類全ての Rab の常時活性化型及び、不活性化型の計１２０種類の変異体を発現させ、メラノソームの局在に影響を与えるものを探索した。１次スクリーニングの結果、１５種類の Rab 変異体の発現によりメラノソームの核周辺への凝集が観察された（常時活性化型の Rab1A、Rab1B、Rab2A、Rab2B、Rab8A、Rab8B、Rab10、Rab11A、Rab11B、Rab12、Rab19、Rab27A、Rab27B、Rab36 及び常時不活性化型の Rab3D）。

これら１５種類の Rab の中には、メラノソームのアクチン輸送の制御因子である Rab27A と微小管逆行性輸送の制御因子である Rab36 が含まれていることから、この実験方法により、メラノソーム輸送に関わる Rab が正しくスクリーニングされることを確認している。しかし、メラノサイトに発現しないことが知られている、Rab27B 変異体の発現によってもメラノソームの凝集が誘導されることから、これら候補の Rab の中にはメラノサイトに発現していないものが含まれることが推測された。そこで次に shRNA を用いた RNA 干渉法による内在性候補 Rab の欠損実験を２次スクリーニングとして行い、さらに候補の絞り込みを試みた。２次スクリーニングの結果、これら１５種類の候補 Rab の内、Rab27A の欠損に加えて、ゴルジ体で機能することが知られている Rab1A の欠損により、メラノソームが核周辺に凝集することを発見した。そこで私はこの Rab1A をメラノソームの微小管順行性輸送に関与する候補分子として、Rab1A のメラノサイトにおける詳細な機能解析を実施した。

Rab1A の欠損によりメラノソームが核周辺に凝集するという実験結果をより確かなものにするために、RNA 干渉法と異なる手法によってメラノサイト内の Rab1A の機能を低下させることを試みた。先ほど説明したように、Rab には活性化型と不活性化型の二つの状態が存在する。Rab の活性化型から不活性化型への移行は、Rab に対する GTPase 促進因子である GAP により促進されることが知られている。このことを利用して細胞に Rab-GAP を過剰発現させ、特定の Rab を不活性化するという手法が、Rab の機能解析において頻繁に用いられる。Rab1A に対する GAP として膜貫通領域を介して ER（小胞体）に局在する、TBC1D20 という分子が既に報告されている。そこで私はまず TBC1D20 の膜貫通領域を除き、TBC1D20 がメラノサイト全体で GAP 活性を発揮できるようにして、この細胞質型の TBC1D20 をメラノサイトに過剰発現させることにより、内在性 Rab1A の不活性化を促進させ、それによりメラノサイト内のメラノソームの凝集が誘導されるか検証した。 その結果、細胞質型 TBC1D20 の過剰発現によりメラノソームの核周辺への凝集が顕著に誘導されることが明らかとなった。一方、Rab1A の不活性化を促進できない、GAP 活性欠損変異体ではメラノソームの凝集が誘導されなかった。これらの結果から、RNA 干渉法による Rab1A の欠損実験と合わせて、Rab1A の機能低下によりメラノソームが核周辺に凝集することが明らかとなった。

また Rab1A が微小管順行性輸送を制御しているのなら、Rab1A がメラノソー

ム上に局在することが予想される。そこで次に Rab1A のメラノサイト内での局在を検証した。まず赤色蛍光タンパク質、RFP をタグした Rab1A をメラノサイトに発現させ、Rab1A の局在を調べた。その結果、既に局在することが知られているゴルジ体に加え、メラノソーム上にも Rab1A の局在が認められた。また内在性 Rab1A がメラノソーム上に局在することを確かめるために、免疫沈降法によるメラノソームの単離・精製を行った。Rab27A に対する特異的な抗体を使って、メラノソーム上に局在する Rab27A を認識させ、メラノソームごと免疫沈降を行った。そしてウエスタンブロットによりメラノソーム上に局在するタンパク質を調べた。その結果 Rab27A やメラニン合成酵素といったメラノソームマーカーとともに Rab1A の検出が認められた。これらの結果からメラノサイトにおいて Rab1A がメラノソーム上に局在することが明らかとなった。

これまでの結果から Rab1A がメラノソーム輸送に関与することが示唆された。しかし Rab1A は元々ゴルジ体において機能するということが既に報告されており、実際にメラノサイトにおいても Rab1A はメラノソームとゴルジ体の両者に局在した。つまり、Rab1A の欠損によるメラノソームの凝集が、ゴルジ体の機能阻害による、間接的な影響であることも考えられた。そこでまずゴルジ体の機能とメラノソーム局在の関連性について、次に Rab1A 欠損によるゴルジ体への影響を調べることで、この可能性について検証した。まずメラノサイトにゴルジ体の機能阻害剤である、ブレフェルディン A を処理し、メラノソーム局在に対する影響を調べた。コントロール細胞ではゴルジ体は核近傍で層状構造をとるが、ブレフェルディン A の処理によりゴルジ体は細胞全体に拡散する。しかし、この時、メラノソーム局在への影響は観察されなかった。この結果からゴルジ体の機能とメラノソームの局在には直接的な関連性がないことが確認された。さらに Rab1A の欠損がゴルジ体の構造に影響するかを確認したところ、Rab1A の欠損により、メラノソームは核周辺に凝集するが、ゴルジ体に関してはこのようにコントロール細胞と同様に核近傍での層状の構造をとり、大きな変化が観察されなかった。これらの二つの結果から Rab1A はゴルジ体の機能を介して間接的にではなく、直接的にメラノソーム輸送に関与していることが強く示唆された。

しかし先ほど説明したように、Rab27、Rab1A の欠損双方でメラノソームは核周辺に凝集する。つまり、静止画による比較では、両者の違いを見出すことができない。そこで Rab27A、 Rab1A 欠損メラノサイトのメラノソームの輸送を

動画解析により定量化することで、両者の差を明らかにすることを試みた。Rab27A、Rab1A 欠損メラノサイトのメラノソーム輸送をタイムラプスイメージング動画により定量化を行った。アクチン輸送のみが欠損している、Rab27A 欠損メラノサイトではメラノソームの長距離の微小管順行性輸送が頻繁に観察された。しかし、Rab1A 欠損メラノサイトでは、メラノソームの長距離の微小管順行性輸送があまり観察されなかった。これらの定量解析を行った結果、Rab1A 欠損メラノサイトでは Rab27A 欠損メラノサイトと比較し、メラノソームの順行性輸送距離、特に長距離の輸送が有意に抑制されていることが明らかとなった。一方で逆行性輸送に関しては、Rab27A 欠損、Rab1A 欠損とも同様の輸送が観察され、有意な差は認められなかった。

セクション１の実験結果をまとめる。メラノソームの微小管順行性輸送に関わる Rab の網羅的スクリーニングを行い、Rab1A を候補分子として同定することに成功した。メラノサイトにおける機能解析の結果、Rab1A がメラノソーム上に局在し、Rab1A の機能低下によりメラノソームの微小管順行性輸送が抑制されることが明らかとなった。これらの結果より Rab1A がメラノソームの微小管順行性輸送の制御因子であると結論づけた。

セクション２　Rab1A によって制御されるメラノソームの微小管順行性輸送メカニズムの解明

Rab1A がメラノソームの微小管順行性輸送を行うためには、メラノサイト内で何らかの kinesin と相互作用することが必要であるが、これには二つの可能性が考えられた。一つは Rab1A が直接的に kinesin と相互作用する場合で、もう一つはエフェクターを介して kinesin と間接的に相互作用する場合である。セクション２ではまずこれら二つの可能性について実験的に検証を行った。

まず Rab1A と kinesin との直接的な相互作用を、酵母ツーハイブリッド法により検証した。既に報告されている、常時活性化型の Rab1A と Rusc2 の相互作用をポジティブコントロールとしてとっている。マウスには全４３種類の Kif 分子が存在する。そこでこれらの tail domain を全てクローニングし、常時活性化型及び不活性化型の Rab1A との相互作用を調べた。しかし常時活性化型または不活性化型の Rab1A と４３種類の Kif との間の直接的な相互作用は一つも発見されなかった。

そこで次にエフェクターを介した間接的な kinesin との相互作用を探索した。

探索にあたり、私は RUN domain を含む分子に着目した。なぜならば、RUN domain を含む分子は Rab を含む低分子量 G タンパク質やモーター分子と相互作用することが報告されていたからである。そこで、RUN domain を含む分子と Rab との相互作用を、酵母ツーハイブリッド法により探索した。その結果、SKIP (SifA and kinesin-interacting protein)という分子を Rab1A 特異的エフェクターとして同定することに成功した。非常に興味深いことに、SKIP は(KLC) kinesin light chain と Kif5 により構成される kinesin-1 と結合することが知られていた。つまり Rab1A が SKIP を介して間接的に kinesin-1 と相互作用することが考えられた。

ここでこれまでに報告されている SKIP の機能を簡単に紹介する。SKIP は N 末端の RUN domain を含む領域を介して Arf-like 低分子量 G タンパク質である Arl8b と結合する。興味深いことに今回の酵母ツーハイブリッド法では RUN domain を含む同じ領域が Rab1A の結合ドメインとして同定されている。またその下流の WD motif を介して KLC2 (kinesin light chain 2)と結合する。SKIP はリソソーム上に局在する Arl8b 及び kinesin-1 と複合体を形成し、リソソームの微小管順行性輸送を制御することが知られていた。

またメラノソームがリソソーム関連オルガネラの一つであることに関しても簡単に触れておく。リソソーム関連オルガネラとは小胞の内腔が低 pH であることやリソソーム関連タンパクが存在するなど、リソソームと共通の特徴を持つオルガネラの総称であり、細胞種特異的にさまざまな種類があることが知られている。SKIP がリソソームの微小管順行性輸送を制御することから、SKIP がその関連オルガネラであるメラノソームの輸送も制御していることが十分に考えられた。そこで私は SKIP、また二つの結合パートナーである Arl8b と Rab1A に着目し、これらの分子のメラノサイトにおける機能解析を行った。

まず Arl8b がメラノサイトにおいてもリソソームに局在するか調べた。メラノサイトではメラノソームとリソソームが独立して存在し、リソソームマーカーである Lamp-1 を染色するとリソソームのみが検出される。RFP タグした Arl8b をメラノサイトに発現させると、Arl8b はリソソームには局在するが、メラノソームには局在しないことがわかった。さらに Arl8b と SKIP をメラノサイトに共発現させた。その結果、過去の報告と同じようにリソソームの輸送が促進化され、リソソームの細胞先端での凝集が誘導されたが、メラノソームの局在には影響がなかった。これらの結果から Arl8b はメラノサイトにおいてもリソソームに局在し、リソソームの順行性輸送は制御するが、一方のメラノソーム輸送は

制御しないことが明らかとなった。

続いて、SKIP がメラノソーム輸送に関与しているか調べるために shRNA を用いた RNA 干渉法により内在性 SKIP をメラノサイトで欠損させた。その結果 Rab1A の欠損同様にメラノソームの凝集が誘導されることが明らかとなった。SKIP の shRNA 耐性変異体を用いたレスキュー実験において凝集が回復しており、この結果がオフターゲット効果でないことを確認している。

さらに kinesin-1 も同様にメラノソーム輸送制御に関わっていることを、siRNA を用いた RNA 干渉法により調べた。まず KLC2 に対する二つの異なる siRNA を作成し、これらを用いてメラノサイトにおいて内在性 KLC2 を欠損させた。その結果、SKIP の欠損と同じようにメラノソームの凝集が誘導された。次に Kif5 をメラノサイトにおいて欠損させるために、メラノサイトにおける Kif5 の発現を調べた。Kif5 には Kif5a、Kif5b、Kif5c の三つのアイソフォームが存在する。RT-PCR によりメラノサイトにおける Kif5 の mRNA の発現を調べたところ、メラノサイトには Kif5b のみが発現していることがわかった。そこで Kif5b に対する二つの siRNA を作成し、これらをメラノサイトに処理した。その結果 KLC2 の欠損と同じく、Kif5b の欠損によってもメラノソームの凝集が誘導された。これらの結果から kinesin-1 もメラノソームの順行性輸送に関わっていることが確認された。

次にメラノサイト内の内在性 Rab1A の免疫沈降実験を行い、Rab1A が SKIP 及び kinesin-1 と実際に複合体を形成しているか検証を行った。Rab1A に対する特異的な抗体を使用し、メラノサイト内の内在性 Rab1A を免疫沈降し、ウエスタンブロットにより共沈タンパク質を調べた。その結果、Rab1A が SKIP 及び kinesin-1 と同じフラクションに検出された。この結果からメラノサイトにおいて Rab1A が SKIP 及び kinesin-1 と複合体を形成していることが明らかとなった。一方、Arl8b の検出は確認されなかったので、Arl8b と Rab1A は SKIP-kinesin-1 に対して別々の複合体を形成していることが示唆された。そこで次に GST-pull down による競合阻害実験を行い、この可能性を検証した。もし Rab1A と Arl8b が SKIP に対して同時に結合する場合、Arl8b の添加により Rab1A と Arl8b が GST タグした SKIP とともに沈降することが予測される。一方 Arl8b と Rab1A が別々の複合体を形成する場合、つまり Arl8b と Rab1A が排他的に結合する場合は Arl8b の添加により Rab1A と SKIP の結合が阻害され、沈降する Rab1A の量が減少することが予測される。競合阻害実験を行った結果、このように Arl8b の添

加量を増やしていくことで、Rab1A と SKIP の結合が阻害されるという結果が得られた。この結果は先ほどの Rab1A 抗体を用いた共免疫沈降実験の結果一致しており、つまり Rab1A は Arl8b と同時に SKIP に結合するのではなく、排他的に結合し、別々の複合体を形成することが明らかとなった。

それでは実際、Rab1A は SKIP-kinesin-1 との結合を介してメラノソームの微小管順行性輸送を制御しているのであろうか。もし実際に微小管順行性輸送を制御しているのなら、常時活性化型の Rab1A と SKIP をメラノサイトに共発現させると、メラノソームの微小管順行性輸送が活性化され、メラノソームが細胞先端に凝集することが予測される。そこで次の実験ではこの可能性について検証した。メラノサイトに EGFP タグした常時活性化型 Rab1A と RFP タグした SKIP を共発現させたところ、両者のメラノソーム上での共局在が観察され、さらに予想通りメラノソームの細胞先端への凝集が有意に誘導された。この結果より常時活性化型 Rab1A と SKIP の共発現によりメラノソームの微小管順行性輸送が活性化されることが明らかとなった。

続いて、Rab1A と SKIP との結合がメラノソーム輸送に必須であることをより強く示すために、Rab1A との結合能を失う SKIP の変異体の作成を試みた。先ほど説明したように Arl8b と Rab1A は SKIP の RUN domain を含む領域と結合する。結合様式をより詳細に調べるために、この領域を C 末端から少しずつ削っていき、Arl8b と Rab1A、それぞれに対する結合を調べた。その結果 Rab1A は SKIP のアミノ酸領域が 186 から 176 に減少した際、顕著に結合が弱まり、さらにアミノ酸領域を減少させると全く結合しなくなることがわかった。一方 Arl8b に関しては、アミノ酸領域を削ることで徐々に結合が弱まっているものの、アミノ酸領域 158 番目までのものでも結合が見られた。この結合様式の違いに着目し、SKIP のアミノ酸領域、159-186 番目、167-186 番目、177-186 番目を除いた変異体を作成し、Arl8b と Rab1A、それぞれに対する結合を調べた。その結果 177-186 番目の領域を除いた Δ177-186 変異体が Arl8b との結合は示すが、Rab1A との結合が失われることがわかった。リコンビナントタンパク質を用いた共免疫沈降実験においても、Δ177-186 変異体は Arl8b とは結合するものの、Rab1A とは結合しないという同様の結果が得られた。そこでこの SKIPΔ177-186 変異体と常時活性化型の Arl8b または Rab1A をメラノサイトに共発現させ、メラノソーム局在に対する影響を調べた。RFP タグした Arl8b の常時活性化型と EGFP タグした SKIPΔ177-186 変異体をメラノサイトに共発現させると、両者は依然としてリソ

ソーム上で共局在し、さらにリソソーム輸送の活性化、つまり細胞先端での凝集が観察された。一方 Rab1A の常時活性化型と SKIPΔ177-186 変異体との共発現にはおいては、メラノソーム輸送の活性化が誘導されなかった。この結果から Rab1A が SKIP との結合を介してメラノソームの微小管順行性輸送を制御していることがより強固に確かめられた。

セクション２の結果をまとめる。Rab1A のエフェクター分子の探索の結果、Rab1A と kinesin-1 を介在する分子として SKIP を同定することに成功した。さらにメラノサイトにおける機能解析の結果、SKIP が Arl8b と Rab1A の２種類の低分子量 G タンパク質を介してリソソームとリソソーム関連オルガネラであるメラノソームの輸送をそれぞれ制御していることが明らかとなった。

セクション３　メラノソームの微小管順行性輸送に関わる kinesin の網羅的スクリーニング

セクション２においてRab1A–SKIPを介したKif5b依存的なメラノソーム輸送の分子メカニズムを明らかにしたが、Kif5b 以外の Kif によっても、メラノソームの微小管順行性輸送が制御されている可能性が、次の二つの根拠により推測された。まず SKIP、kinesin-1 を欠損させた際のメラノソームの凝集率が約４０％程度と、アクチン輸送の欠損と比較して低かったことが挙げられる。また特定の小胞輸送が複数の Kif により制御されることが報告されており、実際、リソソーム輸送は Kif5 及び Kif1bβ により制御されることが知られている。そこでセクション３ではメラノソーム輸送に関わる Kif 分子の網羅的スクリーニングを行った。

ここで kinesin 分子が小胞輸送以外にも細胞内の生理機能を制御していることを簡単に紹介する。kinesin 分子はその sub-family ごとに異なる細胞内の生理機能を制御しており、例えば kinesin4 から kinesin12 は細胞分裂に関わっており、kinesin-13 は微小管の脱重合を制御すること、また C 末端に motor domain を持つ kinesin-14 は微小管を逆行性に移動することが知られている。そこでまず文献データベースを利用し、これらの kinesin 分子を除外し、小胞輸送に関わる Kif の in silico スクリーニングを行った。その結果 Kif5 以外に kinesin-2 に属する 4 種類の Kif、kinesin-3 に属する 7 種の Kif、計１１種類の Kif を候補分子として同定した。そこでこれらの Kif の tail domain をメラノサイトに発現させ、メラノソーム上に局在するものを探索した。

その結果、Kif1bβ の tail domain は過去の報告と同じくリソソーム上に局在した。この結果から、今回のスクリーニングが正しい実験系のもと機能していることが確かめられた。メラノソーム上に局在するものを探索した結果、ある Kif がメラノソーム上に特異的に局在することが明らかとなった。そこでこの Kif をメラノソームの微小管順行性輸送に関わる候補分子として機能解析を行った。

まず、この Kif のメラノソーム局在について詳細に検証するために、tail domain を N 末端と C 末端の二つに分割し、それぞれ tail-N、tail-C と名付け、メラノサイトに発現させた。その結果 tail-C、つまりこの Kif の 837–1100 番目のアミノ酸領域がメラノソームに局在することが明らかとなった。またタンパク質として精製したこの Kif の tail-C もメラノソーム上に局在するか検証を行った。まず T7 エピトープを持つ GST をタグした tail-C を精製し、固定したメラノサイトと反応させた。その後、免疫染色により T7 エピトープを可視化しこれらの観察を行った。その結果、コントロールの T7-GST との反応では、メラノソームは染色されなかったが、この Kif の tail-C とメラノサイトを反応させると、tail-C がメラノソーム上に局在化すること明らかとなった。この結果からこの Kif はメラノソーム上に存在する特定の成分を認識して、メラノソームに局在化することが示唆された。

最後にこの Kif に対する二つの異なる siRNA を作成し、メラノサイトにおけるこの Kif の欠損実験を行った。その結果 Kif5b の欠損と同様にこの Kif の欠損により、メラノソームの凝集が誘導されることが明らかとなった。この結果からこの Kif が実際にメラノソーム輸送に関与していることが示唆された。

セクション３の結果をまとめる。Kif5b 以外のメラノソーム輸送に関わる Kif のスクリーニングを行い、ある Kif を候補分子として同定することに成功した。この Kif の tail doamin はメラノソーム局在化能を持ち、この Kif の欠損によりメラノソームの核周辺への凝集が誘導された。この Kif によるメラノソーム輸送の詳細なメカニズムに関しては今後の実験により明らかにする予定である。

まとめ

本研究内容をまとめる。メラノソームのアクチン輸送及び微小管逆行性輸送メカニズムは解明されてきたが、微小管順行性輸送の分子メカニズムはこれまで実験的に明らかにする試みがなされてこなかった。私はまずメラノソーム輸

送に関わる Rab の網羅的スクリーニングにより、Rab1A を微小管順行性輸送の制御因子として同定することに成功した。さらに詳細な機能解析の結果 Rab1A–SKIP–kinesin-1 複合体がメラノソームの微小管順行性輸送を制御することを解明した。またメラノソーム輸送に関わる Kif の網羅的スクリーニングにより、ある Kif をメラノソームの微小管順行性輸送の制御因子として同定することに成功した。この研究が哺乳類における体色変化の理解や、また細胞内の小胞輸送の理解に少しでも役立てば幸いである。

発表論文

Ishida, M., Ohbayashi, N., Maruta, Y., Ebata, Y. and Fukuda, M.: Functional involvement of Rab1A in microtubule-dependent anterograde melanosome transport in melanocytes. ***J. Cell Sci.*** 125, 5177-5187 (2012).

Ishida, M., Ohbayashi, N. and Fukuda, M.: Rab1A regulates anterograde melanosome transport by recruiting kinesin-1 to melanosomes through interaction with SKIP. ***Sci. Rep.*** 5, 8238 (2015)