

研究報告書

「神経細胞における膜タンパク質選別輸送システムの順遺伝学による解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 佐藤明子

1. 研究のねらい

機能的な神経細胞ネットワークが形成されるためには、個々の神経細胞が軸索・シナプス・樹状突起などの高度に分化した機能ドメインを形成し維持する必要がある。その基盤として、それぞれの機能ドメインに特有のタンパク質を適切に輸送する選択的で調節性の細胞内選別輸送システムが必須である。しかし、そのような細胞内選別輸送の基本的な機構、ならびにその調節機構は、いまだ十分に解明されていない。

本研究では、複数の明瞭な機能ドメインを持つショウジョウバエ視細胞を用いて、各々の膜ドメインへの選別輸送に関わる因子を準飽和レベルで単離し、それを種々の神経細胞で解析することにより、単一神経細胞内の膜ドメインの分化機構と、**神経細胞の多様性実現と神経細胞ネットワークの形成において選別輸送システムが果たす役割**を解明することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

機能的な神経細胞ネットワークが形成されるためには、個々の神経細胞が軸索・シナプス・樹状突起などの高度に分化した機能ドメインを形成し維持する必要がある。その基盤として、それぞれの機能ドメインに特有のタンパク質を適切に輸送する選択的で調節性の細胞内選別輸送システムが必須である。しかし、そのような細胞内選別輸送の基本的な機構、並びにその調節機構は、いまだ十分に解明されていない。

私の研究グループでは、ショウジョウバエ網膜を用いての極性輸送機構の研究に取り組んでいる。ショウジョウバエ視細胞は、頂端面の一部が増幅した光受容膜・その周辺のストーク膜・側底面膜・軸索とシナプスという少なくとも 4 つの明瞭に分極化した細胞膜区画を持つ。さきがけ研究では、EMS 処理したハエについてロドプシンの光受容膜への合成・輸送に関わる因子の網羅的スクリーニングを試みた。さきがけ研究期間中にショウジョウバエの主な染色体腕 5 つのうちの 3 腕について準飽和レベルでスクリーニングを行うことに成功し、322 の変異体を単離した。本報告では、この内、2 グループの変異体についてその表現型と原因遺伝子、また、そこからわかってきたロドプシンの合成輸送に関する知見を紹介する。また、スクリーニングとは別に、側底面輸送の分子機構について新たな知見を得たので、こちらも紹介したい。

(2) 詳細

1) Rab6 は、2 つの頂端面への輸送に関与するが、側底面への輸送には関わらない。一段階的な選別機構が存在する

ロドプシンが光受容膜に蓄積しない変異体の 1 つ、546P 変異体についてロドプシン輸送開始実験(BLICS)を行い、ロドプシン輸送の阻害される過程を詳細に解析した。その結果、546P 変異体ではロドプシンは正常に合成されゴルジ体へ正常に輸送されたが、ゴルジ体から光受容膜への輸送が欠損していた。特に、ゴルジ体にロドプシンが蓄積した後、直接エンドソームマーカーを伴ってゴルジ体から出芽し、そのまま分解すると考えられた(図 1)。また、この変異体では光受容膜への輸送のみならず、ストーク膜への Crb, Eys の輸送も阻害されていたが、 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ の側底面への輸送は正常であった。表現型の原因となる変異を同定した結果、Rab6 遺伝子に入ったノンセンス変異が原因であることが分かった。546P 変異体に野生型の Rab6 を発現させることでレスキューされること、また Rab6 の別のヌル対立遺伝子でも同じ表

BLICS 90min Rab7 Rh1 p120

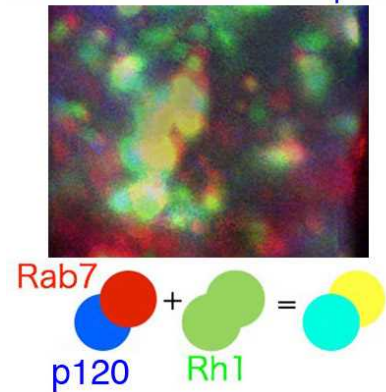


図 1 546P 変異体では輸送開始後 90 分では、ゴルジ体 (p120) とエンドソーム (Rab7) が隣り合って存在し、Rh1 は両方に分布している。

現型が観察されたため、546P 変異体の表現型の原因は Rab6 の欠損であると結論づけた。Rab6 はゴルジ体内部の輸送やポストゴルジ小胞の輸送に関わることが他のシステムにおいて報告されている (Barr, 2009 Semin. Cell Dev. Biol; Storrie, et al., 2010 Traffic)。Rab6 抗体を作成し、その局在を詳細に観察した所、ゴルジ体の trans 面から Rab11 で標識されるリサイクリングエンドソーム(RE)にかけて染色が見られた(図 2)。ゴルジ体の trans 面/TGN では側底面輸送に関わると考えられるクラスリンの重鎖との共局在が観察された。これらの結果から、ショウジョウバエ視細胞では、ゴルジのトランス面或いは TGN において側底面膜へ輸送されるタンパク質の選別が行われ、2 つの頂端面膜へ向かうタンパク質は Rab6 によって一緒に TGN から RE に送られた後、RE で選別されると考えられた(図 3)。これにより多方向へ送られる膜タンパク質の選別が段階的に起ることが明らかとなった(論文準備中)。

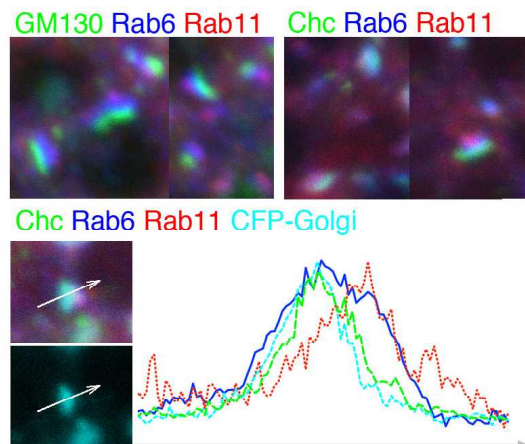


図 2 Rab6 は TGN から RE に局在する。CFP-Golgi は Trans 嚢/TGN マーカー。

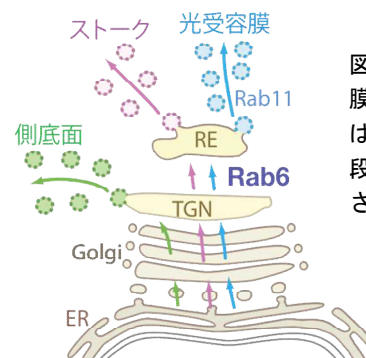


図 3 膜タンパク質は TGN, RE で段階的に選別される。

2) EMC は複数の膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質の合成またはフォールディングに必要である。

真核生物のほとんどの分泌タンパク質・膜タンパク質は、ER 膜上のリボソームにより合成され、トランスロコンにより ER 内腔に輸送、あるいは ER 膜に組み込まれる。ER 膜での膜貫通ヘリックスの脂質二重膜への挿入は、新生鎖の翻訳に並行して随時行われると考えられており、この過程にはトランスロコンに加え TRAM や TRAP/SSR などが関与することが報告されているが、特に複数回膜貫通タンパク質の組み込みのメカニズムは完全に解明されたわけではない。

ロドプシンの光受容膜への合成・輸送に関わる因子の網羅的スクリーニングにより、酵母で同定された ER 膜内で複合体を形成する膜タンパク質群、EMC (ER membrane protein complex) のサブユニットである EMC3 の発現低下変異体 (後にヌル変異を作成)、EMC1、EMC8/9 のヌル変異体が単離された。EMC は、広く真核生物に存在し、その欠損が UPR (unfolded protein response) をひき起こすことなどから、膜タンパク質のシャペロン機能を持つと考えられている (Jonikas et al., 2009 Science; Richard et al., 2013 PNAS)。

我々の行った解析でも EMC は ER に局在しており、その欠損により UPR が誘導されたため、当初は EMC が専らフォールディングに機能すると期待した。ショウジョウバエロドプシンのフォールディングには、プロリン残基を異性化する NinaA が関与しており、NinaA の欠損ではロドプシン合成中間体が小胞体内部に蓄積するので、EMC 欠損細胞での合成中間体の観察を試みたが、その蓄積は全く観察されなかった。さらに EMC/NinaA 二重変異体でもロドプシン合成中間体の蓄積は観察されず、EMC は NinaA よりも早い段階で働くことが示された。このような EMC 欠損のロドプシン合成中間体に対する効果はカルネキシン変異体の表現型と一致している (Rosenbaum et al., 2006, Neuron)。さらに、免疫共沈降法では EMC1・EMC3 がカルネキシンと相互作用していることが分かった。一方、EMC とロドプシン合成中間体や Sec61 との結合は観察されなかった。さらに、EMC 欠損におけるロドプシン合成中間体の欠損が ERAD による分解のためであると考えて、ERAD 変異体との二重変異体の解析を行ったが、ロドプシンの合成中間体を蓄積させる事はできなかった。用いた ERAD 変異体の中には、実際にロドプシンのフォールディング変異体の膜からの引き抜きを阻止できる事が示されている VCP/ter94 の変異体も含まれている (Griciuc et al., 2010, PLoS Genet.)。これらの結果は、EMC はロドプシンが膜に完全に挿入されてから作用するのではなく、全てのヘリックスが膜に挿入し終わる以前、おそらく新生鎖の段階で作用することを示唆している (図4)。

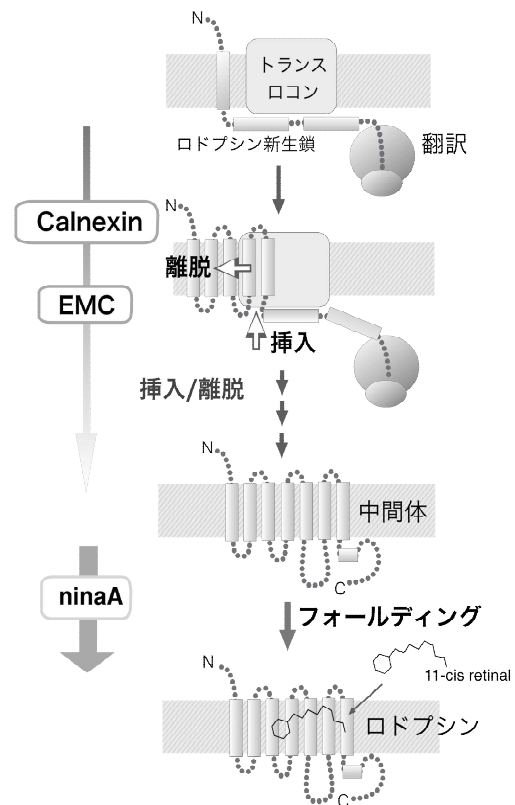


図 4 EMC は複数膜貫通タンパク質の新生鎖のヘリックスの挿入/離脱に作用すると考えられる。

興味深い事に、EMC ヌル変異視細胞ではロドプシンだけでなく、調べた全ての複数回膜貫通タンパク質が発現していなかったが、対照的にI型, II型, IV型の1回膜貫通タンパク質や分泌タンパク質は正常に発現していた。これらの結果からEMCはER膜透過やフォールディングよりも、複数の膜貫通ヘリックスを持つ新生鎖の ER 膜への挿入に関与している可能性が高いと考えられた(論文準備中)。

3) ショウジョウバエ視細胞の側底面膜への極性輸送には哺乳類上皮細胞と同様に AP1 が関与する。

側底面膜への極性輸送については哺乳類の上皮細胞を用いた解析が進んでおり、既に AP1B, クラスリンが関与することが分かっている。ショウジョウバエで唯一の AP1 の欠損変異視細胞の解析を行った。その結果、光受容膜へのロドプシンの輸送やストーク膜への Crb, Eys の輸送は正常であったが、側底面へ輸送される $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ が誤ってストーク膜にも輸送され、正常よりも長いストークを形成していた。この結果は、ショウジョウバエ視細胞の側底面への輸送にも AP1 が関与することを示している (Sato et al, 2013)。

3. 今後の展開

今後は、ロドプシンの光受容膜への合成・輸送が欠損する変異として単離した 322 変異体のうち、まだ詳細な解析を行えていない変異体についてロドプシン輸送の欠損段階の同定や変異遺伝子の同定をすすめると同時に、側底面膜やストーク膜への輸送に関わる因子についても明らかにしていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

EMS により変異導入したハエについて網羅的スクリーニングを行い、重要と考えられる変異体に関して次世代シーケンサーを用いた全ゲノム再シーケンスとマッピングを簡便に行い、迅速に遺伝子同定を行うことに成功した。現在研究室主催の専門実習において学部3年生でも原因となる変異の同定が可能となった。しかし、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム再シーケンスは、さがけ研究期間中に費用が著しく下がると予測されていたが、予想以上に技術革新は遅く、未だ1系統に10万円ほどかかっており、網羅的に多数の変異体について原因変異同定することはできなかった。また、表現型の解析は迅速化できず、1つ1つの変異体について膨大な時間を費やしながらか評価を行っている。そのため、多数の候補変異体の中で、実際に論文を準備できる段階にまで解析が進んだのは2グループの変異のみであった。膨大な変異体資源と変異同定方法を確立できたので、今後の研究の発展が期待できている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

神経細胞においても細胞膜はその機能に応じたドメインに分かれており、それらを維持調整す

るための膜タンパクを積載した小胞のゴルジ体を経由する輸送は細胞内物流の大きな部分を占めている。ショウジョウバエ網膜の視細胞は頂端面の光受容膜をはじめ 4 個の明瞭に区別できる細胞膜区画を有するため、選別輸送システムの解析に有利な材料である。本研究はこれに着目し、ロドプシンの選別輸送の異常を指標として得ていた 300 以上の変異体の中から数個を選び、遺伝子の解析と細胞生物学的イメージングにより、Rab6 が頂端面への輸送に関与するが側底面への輸送には関わらないことを見出して段階的な選別機構が存在することを発見し、一方 ER 膜内で複合体を形成する膜タンパク質 EMC の 2 サブユニットの解析からは ER 膜におけるロドプシン分子の通過儀礼様式を解明したものである。これまでの成果の一部はすでに論文発表しており、国内学会の招待講演も行っている。今後は立ち上げた独自の系を足掛かりにしてこの細胞内選別膜系輸送システムのより広い展望が開け、またそれらの普遍的意義を明らかにする成果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Satoh T, Inagaki T, Liu Z, Watanabe R, **Satoh A.K.†** (2013) GPI biosynthesis is essential for rhodopsin sorting at the trans-Golgi network in *Drosophila* photoreceptors. *Development*. 140, 385–94. doi: 10.1242/dev.083683.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1) **佐藤明子** 分子生物学会 シンポジウム ”細胞の中で膜が動き、ちぎれ、誘導し、いのちが紡がれる”(パシフィコ横浜) (Nov. 24, 2014) 招待講演
 “ショウジョウバエ視細胞において Rab6 は 2 つの頂端面への輸送に必要なが側底面膜への輸送には必要ではない”
- 2) **佐藤明子** 日本学術会議公開シンポジウム (日本学術会議講堂) (July 26, 2014) 招待講演
 “ショウジョウバエ視細胞の明暗順応をつかさどる色素顆粒運動の分子機構”
- 3) **Akiko K. Sato** ESF Symposium, Cell Polarity and membrane trafficking (Warsaw in Poland) (May 10, 2014) 口頭発表
 “Rab6 is essential for plural apical transport pathways but not for basolateral transport pathway in *Drosophila* photoreceptors”
- 4) **佐藤明子** 細胞内ロジスティクス・シンポジウム (淡路夢舞台国際会議場) (Sept. 18, 2013) 招待講演
 “ショウジョウバエロドプシンの合成・輸送の分子機構 –ロドプシン新規シャペロン EMC の同定とその欠損による網膜変性–

準備中の原著論文

1. Rab6 is essential for plural apical transport pathways but not for basolateral transport pathway in *Drosophila* photoreceptors. Iwanami, N. #, Satoh, T. #, Nakamura, Y., Liu, Z. and **Satoh, A.K.†** (in preparation)

2. dPob/EMC is essential for Rhodopsin formation / maturation in *Drosophila* photoreceptors.
Sato, T., Ohba, A., Liu, Z., Inagaki, T. and Sato, A.K.† (in preparation)