様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　22 年　5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20770159
研究課題名（和文）　ショウジョウバエ培養細胞系を用いたリソソーム酵素局在化の分子機構の解析
研究課題名（英文）　Functional analysis of lysosomal protein trafficking in the fruit fly, *Drosophila Melanogaster*.

研究代表者 亀高　諭　（KAMETAKA SATOSHI）
福島県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：10303950

研究成果の概要（和文）：細胞内における膜貫通型蛋白質のオルガネラ間の輸送は主に膜小胞を介して行われる。GGA, AP-1 等のクラスリンアダプターと呼ばれる分子群は、膜蛋白質の選別輸送に必要なクラスリン被覆小胞形成において必須な役割を担っているが、その分子機能および調節機構の詳細は不明な点が多い。本研究に於いてはショウジョウバエの培養細胞系においてこれらの分子群の性状解析を行い、ショウジョウバエ細胞においても哺乳動物細胞と同様なメカニズムでクラスリンアダプターが膜蛋白質輸送において機能していることが示された。

研究成果の概要（英文）：Intracellular trafficking of integral membrane proteins requires formation of transport carriers to reach their final destination. Clathrin coat is a major coatmer responsible for generation of transport vesicles at the post-Golgi compartments. Clathrin adaptors such as GGA and AP-1 function at the Golgi membrane to recruit clathrin from the cytoplasm to the site of clathrin coated vesicle formation. This study was aimed to dissect the functions of GGA and AP-1 using fly cultured cells as a model system for mammals. We carried out the functional characterization of these clathrin adaptors and found that the molecular functions of the clathrin adaptors are highly conserved from fly to mammals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学
キーワード：リソソーム、クラスリン、小胞輸送、エンドサイトーシス、ショウジョウバエ

１．研究開始当初の背景
これまで、多くのゴルジ体に於けるクラスリン被覆小胞形成に関する研究が酵母、哺乳動物を用いた系で行われてきた。特にゴルジ体からのマンノース６リン酸受容体（MPR）の選別輸送に関しては、Bonifacino（NIH,

USA)、 Robinson (Cambridge, UK)、Ohno (RIKEN, Japan)、Nakayama (Kyoto, Japan)、Kornfeld (Washington, USA)、Payne (California, USA)らを初めとする国内外の多くのグループの遺伝学的、生化学的、細胞生物学的アプローチにより、AP-1 及び GGAs らクラスリンアダプターが MPR を含む多くの膜タンパク質の TGN に於ける選別に関わることを示してきた。特に Bonifacino らのグループは RNA 干渉（RNAi）法による遺伝子発現制御系を用いてこれらのアダプター分子がリソソーム蛋白質の正常な輸送に必要である事をヒト培養細胞系を用いて示してきた。これらの知見より、GGA をはじめとするアダプター分子がクラスリン被覆小胞の形成の調節に直接的に関わっている事が示唆される。しかしながら、哺乳動物に於いては構造、機能ともに類似した２種類の MPR が存在する上に、同じく類似した３種類の GGA 蛋白質(GGA1-3)、及び AP-1 のサブユニットにも複数のアイソフォームが発現することから、個々のアダプター分子の機能を RNAi 法により解析するのには限界があり、これらの分子が実際にクラスリン被覆小胞形成に関わっているのか、また AP-1 と GGAs がどのように役割分担をしているのかなど明確な回答の得られていない問題が山積している。
申請者はこれまで主にヒト細胞に於ける AP-1 及び GGAs の機能調節機構について研究を行ってきた。近年、より単純なモデル系としてショウジョウバエの培養細胞系を用いたリソソーム蛋白質のゴルジ体での選別輸送機構の解析をはじめている。ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)は既にゲノムプロジェクトが完了し、全ゲノム DNA 配列から AP1 複合体のサブユニットは１種類づつのみ存在し、ヒトでは３個存在する GGA 遺伝子、２種類ある MPR 遺伝子もショウジョウバエにはそれぞれひとつずつしかないことが分かっている。また、これまで出芽酵母、哺乳動物細胞の実験系から明らかにされてきたポストゴルジコンパートメントで機能する多くの分子が種を超えて保存されていることが知られており、哺乳動物同様のメカニズムを持つ良いモデル系であることが期待される。すでにショウジョウバエの MRP（Lerp）、GGA(dGGA)、AP-1(dAP-1)を初めとする２０余りの関連遺伝子の単離と発現系を構築しており本研究の基礎になる生化学、細胞生物学的データも揃いつつある。

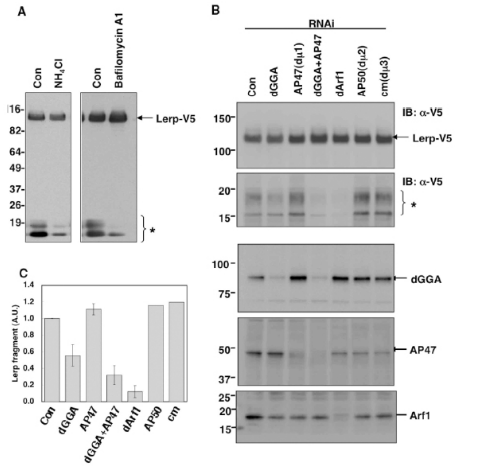
２．研究の目的
本研究はショウジョウバエ S2 細胞に於けるポストゴルジコンパートメント、特に TGN-エンドソーム-リソソーム系のコンパートメントにおけるクラスリンアダプター分子群の詳細な機能解析を目的としている。特に、クラスリンアダプター分子群として dGGA および dAP-1 複合体､それらのカーゴ分子として Lerp、制御分子として Arf1 (Arf79F)の局在化と分子間相互作用について詳細に検討する。更にリソソームへの蛋白質輸送をリソソーム酵素であるカテプシン D(DmCathD)及びカテプシン L(Cp-1)を用いてモニターする手法を確立し、様々な既知因子のノックダウンを行う事によりショウジョウバエに於けるリソソームへの蛋白質輸送経路の素過程を分子ベルで解析する。

３．研究の方法
これまでにショウジョウバエ細胞のポストゴルジコンパートメント、特にリソソーム系オルガネラの形態学的、酵素学的記述は細胞生物学的観点において十分になされていない。リソソーム蛋白質の細胞内選別及び輸送機構の解析を行った例も少なく、モデル系として利用するのには未だ課題が残されている。そのため、この点を踏まえ本研究は大きく二つの部分に分けて遂行される。即ち、

（１）モデル系としてのショウジョウバエ培養細胞系を用いた、リソソーム蛋白質輸送経路のアッセイ系の確立－様々な分子マーカーを用いた S2 細胞のポストゴルジコンパートメント、特にゴルジ体-エンドソーム-リソソーム系の形態学的、酵素学的解析によりこれらオルガネラの規定を行う。
（２）また、カテプシン D 及び L の細胞外誤輸送等を指標にしたリソソーム蛋白質輸送経路のアッセイ系を確立し、これらアッセイ系を用いてショウジョウバエ AP1, GGA, Retromer 等、既知のアダプター分子のノックダウンがカテプシン D のリソソームへの輸送に及ぼす影響等、詳細な機能解析を行う。
（３）リソソーム蛋白質輸送に関与する新規因子のゲノムワイド RNAi を用いた探索、及び DmAP1 複合体、DmGGA、Lerp 等、リソソーム蛋白質輸送関連因子の変異の個体発生に及ぼす影響と病態の解析を行う。特に RNAi スクリーニングにおいては同定されたリソソーム蛋白質輸送に関わる因子の中で哺乳動物にホモログが存在し、かつ機能未知の遺伝子に焦点を当て哺乳動物での機能解析を行う。

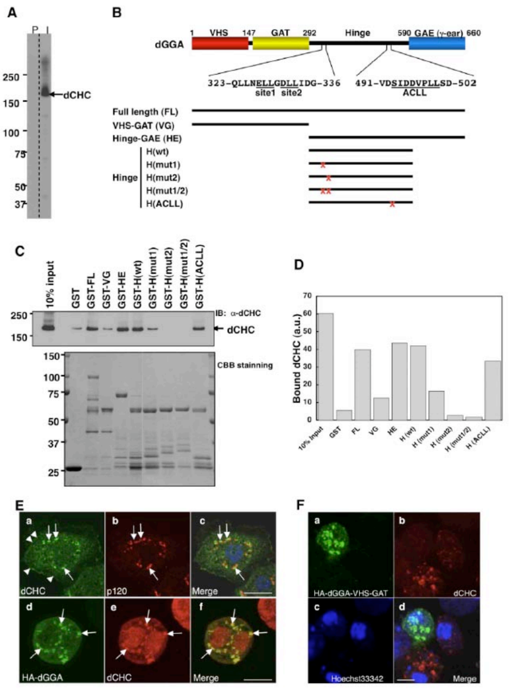
４．研究成果
S2 細胞内におけるクラスリンアダプター及びクラスリンの機能解析を行った結果，内在性クラスリンアダプターdGGA は S2 細胞内においてゴルジ膜に局在し，その局在化は哺乳動物細胞系と同様に活性型 Arf1-GTPase の存

在を必要とした。更にショウジョウバエのMPR オルソローグである Lerp に関してもdGGAはその細胞質に保存されたDxxLLタイプのシグナル配列をその VHS ドメインにおいて認識し、結合することが明らかとなった。
また、dGGA のノックダウンにより Lerp のエンドソーム／リソソームへの輸送が阻害されることがエピトープタグ付加型の Lerp 分子の発現誘導系と RNAi 法を組み合わせた新規アッセイ系において示された（下図、A:Lerp-V5 がリソソーム系で限定分解されることを示す。B：dGGA, dAP-1 のノックダウンにより Lerp-V5 の限定分解が抑制されることから、これらのクラスリンアダプター分子群が Lerp の順行輸送において機能していることが示唆される）。



更に、内在性クラスリン重鎖 dCHC は dGGA とゴルジ体で共局在し（右上図 A,E)、dGGA のクラスリン結合能に関して詳細な解析を行った結果、dGGA の Hinge 領域にクラスリン結合配列を見いだした。この領域を欠く dGGA 変異体を S2 細胞に強制発現させることにより、内在性クラスリンのゴルジ体における局在が失われたことから dGGA が細胞内に於いてもクラスリンのゴルジ体膜へのリクルートに関与していることが強く示唆された（右上図 B,C,D)。以上の結果より、ショウジョウバエにおいても哺乳動物細胞に類似したシステムによりゴルジ体における膜蛋白質の選別輸送が行われていることが強く示唆された。

これまで，ショウジョウバエの細胞系におけるゴルジ体局在型クラスリンアダプターの解析は全くされておらず、世界的にも Robinson らのグループとともに我々のグループが最先端の研究を行っている。これまでクラスリンに関してはエンドサイトーシスに関しての研究がほとんどであり，内在性クラスリンがショウジョウバエに於いてもゴルジ体に局在するという知見は細胞生物学，発生生物学の分野において非常に重要な知見である。



５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計１件）

①. Satoshi Kametaka, Naoki Sawada, Juan S. Bonifacino and Satoshi Waguri. ‘Functional characterization of protein-sorting machineries at the *trans*-Golgi network in *Drosophila melanogaster.*’ Journal of Cell Science (2010) 123: 460-470 (査読あり）

〔学会発表〕（計４件）

①. 亀高諭、澤田直樹、池田寛子、和栗聡「リソソーム酵素の選別輸送メカニズムの解析」、第 115 回日本解剖学会全国学術集会、2010 年 3 月 28 日、盛岡

②. 亀高諭、Juan S. Bonifacino、和栗聡「ショウジョウバエ細胞を用いたクラスリンアダプターの機能解析」、第 61 回日本細胞生物学会大会、2009 年 6 月 4 日、名古屋

③. 亀高諭、和栗聡「ショウジョウバエ細胞を用いたクラスリンアダプターの機能解析」、第 114 回日本解剖学会全国学術集会、2009 年 3 月 28 日、岡山

④. 池田寛子、亀高諭、和栗聡「HeLa 細胞で見られた GGA1,2,3 の特異的発現低下による表現型の違い」、第 60 回日本細胞生物学会大会、2008 年 6 月 30 日、横浜

〔図書〕(計1件)

①. 亀高諭、Juan S. Bonifacino、共立出版、蛋白質核酸酵素、2008 年 12 月号増刊 Vol.53 No.16 (p.2046-2052)、「ポストゴルジではたらくクラスリンアダプター、AP-1 およびGGA の機能調節機構」

〔その他〕
ホームページ等
http://www.fmu.ac.jp/cms/anatomy2/index_html

６．研究組織
(1)研究代表者　亀高　諭　(KAMETAKA SATOSHI)
福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：10303950

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし