

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790071

研究課題名 (和文) 線虫の神経系および筋肉に発現する ABC 輸送体 HAF-2 の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of an ABC transporter HAF-2, which is expressed in neurons and muscles in *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

白石 博久 (SHIRAISHI HIROHISA)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：80393156

研究成果の概要：HAF-2 は、リソソームに局在する哺乳類ABC輸送体の線虫ホモログの一つであり、神経系、筋肉、一部の腸細胞、および貪食細胞で発現する。貪食細胞においては、HAF-2はリソソーム様の細胞内顆粒に局在しているが、顆粒の形成や、細胞外からの異物の取り込みには必須でないことを明らかにした。神経系では、HAF-2は頭部および尾部の感覚神経に局在していた。*haf-2* 遺伝子欠損変異体を用いた解析では、成長速度や寿命、産卵数、排泄周期等において表現型が観察された。細胞内輸送体の欠損が個体レベルの多様な生理機能に影響を及ぼしていることを見出したという点で意義深い。

研究成果の概要 (英文) : HAF-2, which is one of the nematode homologues of human lysosomal ABC (ATP-binding cassette) transporter, is expressed in neuronal cells, muscles, some of intestinal cells, and coelomocytes in *Caenorhabditis elegans*. We found that at least in coelomocytes, HAF-2 localizes on the lysosome-related granules and is not essential for the uptake of foreign substances. HAF-2 was also expressed in neuronal cells including amphid and phasmid sensory neurons. The deletion for the *haf-2* gene showed the slight defects in growth rate, lifespan, brood size, defecation rate, and so on, suggesting that the intracellular lysosomal transporter is involved in the various physiological aspects at the organismal level.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：線虫、ABC 輸送体、リソソーム、貪食細胞、神経、筋肉

1. 研究開始当初の背景

細胞は形質膜や細胞内小器官を構成する膜を介して、様々な物質の輸送、老廃物や毒素の排出を行うことにより、恒常性を維持している。これらの物質輸送を担う蛋白質のうち、最も大きなスーパーファミリーを形成するのがABC (ATP-binding cassette) 輸送体であり、個々の輸送体に特異的で、実に多様な基質の運搬・排出に関わることが知られている。

TAPL (TAP-Like) は、抗原ペプチド輸送体 TAP (transporter associated with antigen processing) との遺伝子構造の類似性から命名された、ABC 輸送体ファミリーに属する膜蛋白質である (Yamaguchi Y. et al., FEBS Lett. 457. 231-236 (1999), Kobayashi A. et al., J. Biochem. 128. 711-718 (2000))。真核生物においては、TAPを含め殆どのABC輸送体は小胞体もしくは細胞膜に存在し、細胞質側からの基質の搬出に働くとされている。一方、TAPLは主にリソソームに局在することから、細胞内不要分子の取り込み・分解に関わるリソソーム関連ABC輸送体として極めて特徴的な輸送体蛋白であることが予想されるが、TAPLのノックアウトマウスでも顕著な表現型が観察されておらず (海外グループ、私信)、生体内におけるその生理機能についてはよく分かっていなかった。

高等脊椎動物の獲得免疫系において抗原提示に必須なTAPと異なり、TAPLは広く種を超え、無脊椎動物の線虫にもそのホモログが存在する。そこで、研究代表者の所属する研究室では、多細胞生物としては最も単純なモデル生物である線虫を用いて、リソソーム関連ABC輸送体の生理機能とその分子基盤を明らかにしようと試みている。線虫には3つのTAPLホモログ、HAF-2、HAF-4、HAF-9が存在する。このうちHAF-4とHAF-9については、線虫腸細胞の細胞内顆粒膜上に局在し、非酸性ながらリソソームマーカー陽性の腸内顆粒の正常な形成と維持に必要なこと、および個体の成長遅延が見られることが変異体を用いた解析から明らかとなった。一方、HAF-2は、HAF-4およびHAF-9とは発現パターンが異なり、一部の神経細胞や腸細胞、咽頭や体表の筋肉、および貪食細胞 (シエロモサイト) に発現が観察され、*haf-2* 遺伝子欠損変異体では、低温生育条件下での成長遅延が認められた。これらの結果は、TAPLホモログに起因する個体レベルでの形質を初めて示したものであり、当研究室に

おける表現型の解析が、個体レベルの機能解析としては世界を一步リードしている状況にある。

HAF-2の発現組織である神経や筋肉は異常蛋白質の蓄積の影響を受けやすく、ヒトでもニューロパチーやミオパチーなどに代表される神経変性疾患や筋萎縮がよく知られている。また、ヒトやマウスのTAPLは、脳、脊髄および精巣での高発現が報告されていることから (Yamaguchi Y et al., FEBS Lett. 457. 231-236 (1999), Zhang F. et al., J. Biol. Chem. 275. 23287-294 (2000))、HAF-2の神経系での発現との間に、進化上の機能的な保存も予想される。このような観点から、細胞内物質消化、異物分解の主役であるリソソーム関連オルガネラの形成・維持に関わるABC輸送体の線虫ホモログの生理機能の解析は、ABC輸送体の研究に一石を投じるだけでなく、将来医薬学領域においてもその有用性が増してくると期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、リソソーム様オルガネラに発現するABC輸送体TAPLの線虫ホモログのうち、HAF-2の機能を解明することにある。(1) HAF-2が発現する細胞内オルガネラ、およびその形成・維持におけるHAF-2の役割を生化学的・細胞生物学的手法で解析し、更に、(2) 線虫の個体レベルでの生理機能におけるHAF-2の役割を *haf-2* 遺伝子欠損変異体を用いて解析することにより、HAF-2を介した細胞内のオルガネラ形成、物質代謝および異物排除に関わる生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HAF-2の生体内局在の解析: *haf-2* 遺伝子のプロモーターの制御下に緑色蛍光蛋白質 GFP融合型HAF-2 (HAF-2::GFP) もしくは赤色蛍光蛋白質 mCherry 融合型 HAF-2 (HAF-2::mCherry) を発現する遺伝子を染色体外アレイとして導入した線虫を作製し、共焦点顕微鏡を用いて蛍光蛋白質融合型HAF-2の発現組織の解析を行った。

(2) 貪食細胞におけるHAF-2局在オルガネラの同定: リソソームマーカー蛋白 (ASP-1::DsRed, LMP-1::mRFP, LMP-1::GFP)、および初期エンドソームマーカー (2xFYVE::GFP) を HAF-2::GFP もしくは HAF-2::mCherry と共発現

させた個体を作製し、シエロモサイトにおける細胞内局在を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

(3) 貪食細胞のリソソーム様オルガネラの形成・維持におけるHAF-2の役割：*haf-2* 遺伝子欠損変異体 (*gk13*) は、CGCストックセンターから取り寄せた。また、一般にABC輸送体の基質輸送活性に必要とされているWalkerA配列に変異 (K567M) を導入したHAF-2 (K567M)::GFP発現ベクターを作製し、線虫に遺伝子導入した。

(4) 貪食細胞の機能におけるHAF-2の役割：腸細胞から分泌型のGFPを産生する線虫と*haf-2* 遺伝子欠損変異体を掛け合わせ、蛍光顕微鏡下でシエロモサイトへのGFPの取り込み、および蓄積を観察した。

(5) 腸細胞におけるHAF-2の異所発現：腸細胞特異的 *haf-4* 遺伝子のプロモーターの制御下に緑色蛍光蛋白質 GFP 融合型 HAF-2 (HAF-2::GFP) を発現する遺伝子を染色体外アレイとして導入した線虫を作製し、共焦点顕微鏡を用いて蛍光蛋白質融合型HAF-2の腸細胞における局在を観察した。

(6) *haf-2* 遺伝子欠損変異体の個体レベルの表現型の観察：成長速度、寿命、産卵数、排泄周期、および便秘について、*haf-2* 遺伝子欠損変異体を野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) HAF-2の生体内局在の解析：HAF-2は、体壁筋、咽頭筋、および腸第一細胞（最も口に近い側の腸細胞）および腸第九細胞（最も肛門に近い側の腸細胞）においては細胞内に粒状に散在していたが、貪食細胞であるシエロモサイトにおいては、細胞内顆粒膜上にリング状に局在していた。また、神経系では、おもに神経細胞体への局在が観察されたが、HAF-2の発現量の多い個体では、神経突起にも局在が観察された。神経細胞染色試薬 (DiI) を用いた共染色の結果から、頭部のamphid neuronsや尾部のphasmid neuronsを含む感覚神経に発現していることが明らかとなった。筋肉におけるHAF-2の局在解析については、観察に耐え得るレベルの蛍光蛋白質融合型HAF-2::GFPを安定に発現する個体の作製が計

画通りに進まず、再現性のある結果が得られていない。

(2) 貪食細胞におけるHAF-2局在オルガネラの同定：細胞内オルガネラや貪食活性に関する解析が他の組織よりも進んでいるシエロモサイトにおけるHAF-2の解析を進め結果HAF-2は、リソソームマーカ蛋白 (ASP-1、LMP-1) が局在する顆粒の表面に局在し、初期エンドソームマーカ蛋白 (2xFYVE::GFP) 陽性顆粒には局在しなかった。これらの結果は、腸細胞に発現するHAF-4やHAF-9同様、少なくともシエロモサイトにおいて、HAF-2がリソソーム様オルガネラに局在している事を示している。

(3) 貪食細胞のリソソーム様オルガネラの形成・維持におけるHAF-2の役割：HAF-2が、その局在する顆粒の形成・維持に関与しているかどうかを知るために、*haf-2* 遺伝子欠損変異体のシエロモサイトを観察した。その結果、LMP-1::GFP陽性顆粒は野生型と同様に形成されていた。また、ABC輸送体で基質輸送活性に関わると予想されるWalkerA配列に変異 (K567M) を導入したHAF-2の強制発現を試みた。その結果、シエロモサイトにおける局在顆粒の形態には特に顕著な異常は観察されなかった。これらの結果は、その発現、および基質輸送活性が腸内顆粒の正常な形成に必須なHAF-4、HAF-9とは異なり、HAF-2は、シエロモサイトの細胞内顆粒の形成・維持には必須ではない事を示唆している。

(4) 貪食細胞の機能におけるHAF-2の役割：*haf-2* 遺伝子欠損変異体 (*gk13*) を用いて、シエロモサイトによる異物 (分泌型GFP) の取り込み、および細胞内への蓄積に *haf-2* 遺伝子の欠損が与える影響を調べた。その結果、野生型との差異は見出されなかった。少なくとも、細胞外の蛋白性分子の取り込みや細胞内蓄積への関与は殆どないと考えられる。

(5) 腸細胞におけるHAF-2の異所発現：そもそも哺乳類のTAPLホモログとして着目したHAF-4およびHAF-9と、HAF-2の発現組織の違いが、単に組織特異的な発現制御のレベルの違いなのか、それとも機能的にも異なるのかを調べるために、HAF-4の遺伝子プロモーター領域を用いてHAF-2::GFPを消化管全体に発現させた個体を作製した。その結果、腸細胞内に

において、HAF-2がHAF-4とは明らかに異なる細胞内局在パターンを示したことから、HAF-2がその発現組織において果たす機能は、消化管におけるHAF-4のそれとは異なる可能性が示唆された。各組織におけるリソソーム様顆粒の多様性の一端を、組織特異的な細胞内ABC輸送体が担っているのではないかと考えられる。

(6) *haf-2* 遺伝子欠損変異体の個体レベルの表現型の観察：*haf-2* 遺伝子欠損変異体は、成長遅延および短寿命を示すことを見出した。更に、産卵数の減少、排泄周期の延長、および便秘頻度の増加が観察された。これらの表現型が、本来HAF-2が発現しているいずれの組織の機能不全によるものかについては明らかにできていないが、細胞内輸送体の欠損が個体レベルの多様な生理機能に微妙な影響を及ぼしうることを見出したという点で意義深い。

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 2 件)

① H. Kawai, T. Tanji, H. Shiraishi (以上共筆頭著者)他12名

Normal formation of *Caenorhabditis elegans* intestinal granules requires ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9, which are highly homologous to human lysosomal peptide transporter TAPL (TAP-like). *Mol. Biol. Cell* 査読有 Vol. 20 (2009) pp. 2979-90.

② T. Tanji, H. Shiraishi, S. Natori, A. Ohashi-Kobayashi

Differential activation of the lectin and antimicrobial peptide genes in *Sarcophaga peregrina* (the flesh fly)

Arch. Insect Biochem. Physiol. 査読有 Vol. 69 (2008) pp. 189-198

[学会発表] (計 8 件)

① Takahiro Tanji *et al.*

Functional analysis of lysosomal peptide transporters in *C. elegans*

BIT's 3rd Annual Protein and Peptide Conference [PepCon-2010]

2010年3月21日 北京、中国

② 白石 博久 他

Functional profile of a lysosomal ABC transporter HAF-2 in *Caenorhabditis elegans*

第32回日本分子生物学会年会

2009年12月12日 横浜

③ Hirohisa Shiraishi *et al.*

Physiological roles of putative intracellular peptide transporters in *C. elegans*

3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium

2009年11月9日 チェジュ島、韓国

④ Takahiro Tanji *et al.*

Comparisons of the subcellular localization and mutant phenotypes of intracellular ABC transporters HAF-4 and HAF-9 with LMP-1 in *C. elegans* intestinal cells

17th International *C. elegans* Meeting

2009年6月25日 ロサンゼルス、米国

⑤ 白石 博久 他

線虫腸細胞のリソソーム関連オルガネラ形成におけるABC輸送体HAF-4、HAF-9の役割

BMB2008 (第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会)

2008年12月9日 神戸

⑥ 丹治 貴博 他

線虫の補体系因子 C3 様蛋白質 thioester-containing protein (TEP) の発現解析

BMB2008 (第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会)

2008年12月9日 神戸

⑦ 白石 博久 他

線虫リソソーム関連輸送体の変異体に見られる腸内オルガネラ異常の解析～透過型電子顕微鏡を用いた超微細構造の観察～

第47回日本薬学会東北支部大会

2008年10月26日 矢巾

⑧ Takahiro Tanji *et al.*

Role of the *Caenorhabditis elegans* ABC
transporter genes in the biogenesis of
intestinal lysosome-related organelle

2008 East Asia *C. elegans* Meeting

2008年4月18-21日 上海、中国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 博久 (SHIRAISHI HIROHISA)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 80393156

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし