

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570167

研究課題名(和文) ショウジョウバエを用いたライソゾーム/ライソゾーム関連オルガネラの形成機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms on biosynthesis of lysosome-related organelles

研究代表者

亀高 諭 (Kametaka, Satoshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10303950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：エンドソーム、ライソゾームなどのポストゴルジの小器官で機能する蛋白質はトランスゴルジ網(TGN)において目的の小器官への経路へと選別される。この仕分けの過程は細胞機能特異的なポストゴルジのコンパートメント、すなわちライソゾーム関連オルガネラ(LRO)を形成する時にも必須な役割を演じている。本研究においてはショウジョウバエモデルを用い、ゴルジ体に局在するクラスリンアダプター分子群がLRO及びライソゾームの生合成に重要な役割を演じていることを明らかにし、同時にショウジョウバエがヒトライソゾーム蓄積症候群の良いモデル系となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Targeting of endosomal or lysosomal proteins to their destinations requires sorting mechanisms at the trans-Golgi network (TGN) in the secretory pathway. The sorting event is also prerequisite for de novo generation of cell-type specific post-Golgi compartments such as lysosome related organelles (LRO). In this study, we found that the Golgi-resident clathrin adaptor proteins play essential roles in synthesis and functional maintenance of lysosomes and LROs using the fruit fly as a model organism.

Flies lacking AP-1 showed enlarged photoreceptor neurons and significant accumulation of pigment granules in the pigment epithelia. Morphological and immunocytochemical analyses suggested that appearance of these aberrant structures are accompanied with missorting of lysosomal proteins, suggesting that the sorting event at the TGN is also required for generation of pigment granules.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ライソゾーム ライソゾーム関連オルガネラ 色素顆粒 光受容神経細胞 ライソゾーム蓄積症候群

1. 研究開始当初の背景

ライソゾームは様々な代謝酵素を有する酸性オルガネラであり、その機能は細胞の恒常性維持に必須である。ライソゾームの機能不全により細胞レベルでは主に物質代謝に必要な酵素が欠乏する事によるライソゾーム内での基質の蓄積が引き起こされ、様々な遺伝疾患の原因となる。また、メラノサイトにおけるメラノソームや cytotoxic T リンパ球における lytic granule に代表されるライソゾーム関連オルガネラ (Lysosome-related organelles: LRO) は細胞種特異的機能に特化した機能を担っており、LRO の生合成異常もまた Hermansky-Padlak syndrome (HPS) を初めとする遺伝疾患の原因となることが知られている。これまでに LRO の生合成に関する分子メカニズムに関しては、ポストゴルジのコンパートメントにおける膜交通に関わる様々な因子が関わることが示されてきた。

近年我々はトランスゴルジ網で機能するクラスリンアダプター分子群の生理的意義を明らかにする目的で、ショウジョウバエをモデルとした解析をスタートした。ショウジョウバエはゲノムサイズが小さく、哺乳動物に見られることの多い遺伝子重複が少ないため、RNA 干渉法 (RNAi) を用いた遺伝子機能解析が有効である。また、これまでにクラスリンアダプター分子群に関してもシンプルな遺伝子構成であることが示され、これらの分子の機能がショウジョウバエからヒトまで保存され、生体内において機能的なライソゾームの維持に重要であることが示された (Kametaka et al., 2010)。

2. 研究の目的

本研究においては、ゴルジ体で機能するクラスリンアダプター分子群、AP-1 及び GGA がライソゾーム機能、及び LRO の生合成の過程においてどのように関わるかを明らかにする。(1) 特に、AP-1 の欠失によりショウジョウバエ複眼の光受容神経細胞を取り囲む色素細胞に色素顆粒の異常な蓄積が見られることから、これらの細胞において、AP-1 が LRO の一つと考えられている色素顆粒の生合成に関わっていることが示唆されていたことで、これらの細胞における AP-1 の機能解析を行い、同時に(2) AP-1, GGA により細胞内輸送が制御されているライソゾーム酵素受容体 (LERP) の欠失により細胞に引き起こされる現象を解析し、クラスリンアダプター群の生理的意義を明らかにすることを目的にしている。

3. 研究の方法

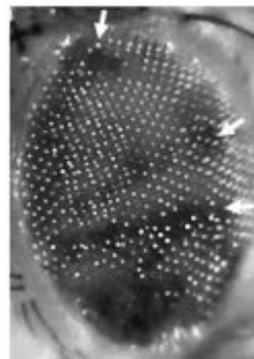
先行研究により、ショウジョウバエにおいてゴルジ局在型クラスリンアダプター分子が哺乳動物と同様の機能を有することを明らかにしてきた (Kametaka et al., 2010)。

ショウジョウバエにおけるライソゾーム関連オルガネラの形成機構を明らかにする目的で様々な膜交通関連因子及びクラスリンアダプター群を部位特異的のノックダウンにより発現制御を行い、表現型を解析した。

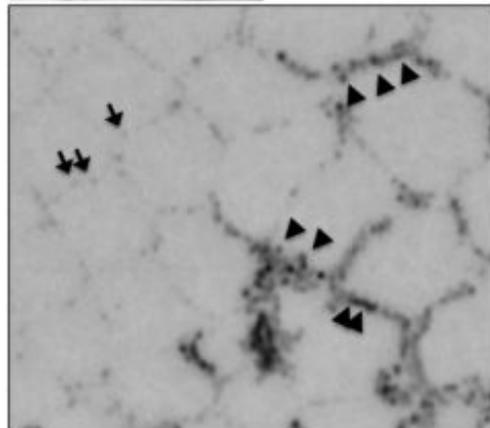
また、S2 培養細胞系を用い、LERP の発現低下細胞株を作製することにより、LERP が通常輸送している分子群を細胞外の培養液から単離抽出することで、LERP のリガンドとなる分子を網羅的に同定することにチャレンジした。

4. 研究成果

(1) 部位特異的な GAL4 ドライバーを用いた AP-1 の発現低下により、ショウジョウバエ成虫の複眼において顕著な色素顆粒の蓄積が観察されたことから、複眼色素細胞における色素顆粒形成に AP-1 が重要な役割を担っていることが明らかになった (図 1)。



(図 1) 部分的に dAP1 を欠失したショウジョウバエの複眼において色素沈着が見られ(左図、矢印)、組織切片においても野生型色素細胞における色素顆粒(矢印)に比べて dAP1 欠損細胞において異常な色素顆粒の蓄積(矢頭)が観察される。



さらに、色素顆粒の代謝に関わる分子機構を明らかにする目的で、色素顆粒を標識するためのツールとして、色素顆粒上に局在する ABC トランスポーターをコードする white, Scarlet 遺伝子のクローニングを行い、GFP-及び mCherry-タグを付した両遺伝子を作成した。

(2) 個体を用いた解析に加え、ライソゾームの生理的意義を明らかにする目的で、ショウジョウバエ培養細胞系を用いたライソゾーム酵素輸送機構の解析を進めた。Schneider S2 細胞系を用い、恒常的にライソゾーム酵素輸送体である Lerp 遺伝子をノックダウンした細胞株 (Lerp-kd 細胞) を作成した。

Lerp-kd 細胞はライソゾームの蛋白質分解酵素である cathepsinD のライソゾームへの輸送に欠損を示した事から、Lerp 依存的に輸送されるリガンドの解析に有用であることが示された。さらに Lerp リガンドを探索するために同細胞から分泌される糖蛋白質を様々なレクチンを用いて回収し、質量分析により同定を行った。単離された分子の中には哺乳動物の Saposin に類似した分子、Sapr (Saposin-related)が発見された。Saposin はライソゾーム蛋白質であり、糖蛋白質の分解代謝に重要な役割を持っておりライソゾーム蓄積症候群の原因遺伝子としても知られている。ショウジョウバエの脳において Sapr をノックダウンすることで自家蛍光物質のライソゾームへの蓄積が観察されること(図2)から、ショウジョウバエがライソゾーム蓄積症候群の良いモデル系になる可能性を示した。

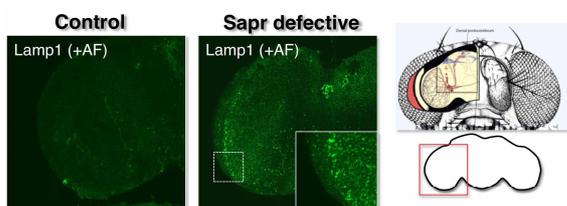


図2 Saprノックダウンによりハエの脳の神経細胞に自家蛍光物質(not shown)を含む肥大したライソゾームが蓄積する

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 2 件)

Shiba Y, Kametaka S, Waguri S, Presley JF, Randazzo PA : ArfGAP3 regulates the transport of cation-independent mannose 6-phosphate receptor in the post-Golgi compartment. **Curr. Biol.** 2013; 23(19): 1945-1951

Kametaka S, Kametaka A, Yonekura S, Haruta M, Takenoshita S, Goto S, Waguri S : The AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in the Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*. **J Cell Sci** 125:634-48

[学会発表](計 11 件)

Waguri S, Uemura T, Yamamoto M, Kametaka A, Sou Y, Yabashi A, Yamada A, Annoh H, Kametaka S, Komatsu M : A cluster of isolation membrane-associated tubules represents a part of omegasome during final steps of autophagosome formation. 2014 ASCB meeting : 2014 年 12 月 : Philadelphia

植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋

あつ子, 山田茜, 安納弘道, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡 : オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与する. 第 14 回日本蛋白質科学会年会 : 2014 年 6 月 : 横浜

植村武文, 山本雅哉, 亀高愛, 曾友深, 矢橋あつ子, 山田茜, 安納弘道, 亀高諭, 小松雅明, 和栗聡 : オートファジー隔離膜の形成過程には小胞体由来細管集合体が関与する. 第 66 回日本細胞生物学会大会 : 2014 年 6 月 : 奈良

亀高諭, 和栗聡 : ライソゾーム病関連因子のモデル生物を用いた解析. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 : 2014 年 3 月 : 栃木

石塚幹太郎, 亀高諭, 植村武文, 和栗聡 : マウスにおけるクラスリンアダプター-GGA の組織分布解析. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会 : 2014 年 3 月 : 栃木

石塚幹太郎, 亀高諭, 植村武文, 和栗聡 : ゴルジ局在型クラスリンアダプター-GGA の局在解析. 日本解剖学会第 59 回東北・北海道連合支部学術集会 : 2013 年 9 月 : 札幌

Satoshi Kametaka and Satoshi Waguri : Functional characterization of lysosomal enzyme receptor protein (LERP) in *Drosophila*. XXIII International Symposium on morphological Science 2013 : 2013 年 9 月 : 新潟

Satoshi Kametaka : Functional characterization of lysosomal enzyme receptor protein (LERP) in *Drosophila*. International Symposium Anatomical Science for advance in health and clinical therapy 2013 (ASahct 2013) : 2013 年 8 月 : 仙台

亀高諭, 上野隆, 和栗聡 : ショウジョウバエを用いたライソゾーム蛋白質輸送機構の解析. 第 65 回日本細胞生物学会大会 : 2013 年 6 月 : 愛知

亀高諭, 和栗聡 : ライソゾーム酵素局在化に関わる選別受容体 Lerp の生理機能解析. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 : 2013 年 3 月 : 香川

石塚幹太郎, 亀高諭, 植村武文, 和栗聡 : ゴルジ体局在型クラスリンアダプター-GGA の機能制御機構の解析. 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会 : 2013 年 3 月 : 香川

[図書](計 1 件)

Kametaka S, Waguri S : Visualization of

TGN-endosome trafficking in mammalian and *Drosophila* cells. **Methods Enzymol** 2012;504:255-71

6 . 研究組織

(1)研究代表者

亀高 諭 (KAMETAKA SATOSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10303950