

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291044

研究課題名(和文)セマフォリンシグナルによる多様な細胞特性制御の解明

研究課題名(英文)A study on semaphorin-regulated diverse cellular events

研究代表者

高木 新 (Takagi, Shin)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90171420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では線虫*C. elegans*を材料にして、セマフォリンシグナルとシナプトタグミンを介した小胞動態制御の関係を遺伝学的・細胞生物学的に解明した。これまでシナプトタグミンはアダプターであるストーニンと共に神経軸索終末でのシナプス小胞のリサイクルを調節することが知られていたが、今回の研究で線虫ray表皮細胞におけるエンドサイトシスを担う主要な因子であることが明らかになった。セマフォリンシグナルはこのシナプトタグミン依存性エンドサイトシスを発生時期特異的に抑制し、また、同時にシナプトタグミンを含む小胞のリソゾームへの輸送を促進する。これらの小胞動態変化が細胞形態の変化を引き起こす。

研究成果の概要(英文)：In this study we have studied regulation of vesicle transport by the semaphorin signal in the nematode *C. elegans*. Through genetic as well as cell-biological analyses, we have demonstrated that semaphorin negatively regulates endocytosis in ray epidermal cells. We also revealed that the synaptotagmin1/Stonin2 system, a well-known regulator of synaptic vesicle recycling in neurons, plays a critical role in vesicle transport in ray epidermal cells. Our study shows importance of participation of the semaphorin-regulated vesicle transport in regulation of the cell shape.

研究分野：発生生物学

キーワード：セマフォリン 表皮 エンドサイトシス シナプトタグミン 線虫 器官形成

## 1. 研究開始当初の背景

セマフォリンとその受容体のプレキシンは共に Sema ドメインで特徴づけられるタンパク質であり、動物に普遍的に存在する。それぞれのタンパク質分子は大きなファミリーを形成し、様々な組織で発現している。セマフォリン-プレキシン系の重要な機能の一つとして、細胞形態制御が挙げられる。例えば脊椎動物では神経回路や心・血管系、表皮系など様々な組織の形成過程での細胞形態・運動性調節に関わることが知られている。また、免疫系の活性化、神経損傷時の神経線維再生やがん転移に関与することから医療の面からも注目されている。

セマフォリンによって引き起こされるプレキシン下流の細胞内シグナル伝達分子機構は、セマフォリン研究の焦点の一つである。脊椎動物培養神経細胞系を材料とした研究から、プレキシン下流細胞内シグナル伝達はプレキシン直下で Rap の抑制によって開始され、また、Fyn、CDK5 などのリン酸化酵素や MICAL、Offtrack などの因子が関与することが明らかになっている。一方、セマフォリンシグナルの主要な出力としては、細胞骨格中のマイクロフィラメントの制御系、微小管の制御系、および蛋白質翻訳制御系、の3経路が示されている。さらに最近では神経細胞成長円錐におけるエンドサイトシスがセマフォリンシグナルによって促進されることが明らかになった。しかし、これら多様な出力と前述の因子との関係は確定しておらず、統一的な伝達経路像の形成には至っていない。

セマフォリンシグナル伝達分野では、本格的な遺伝学的アプローチは限られていた。私達は *C. elegans* プレキシン A 遺伝子である *plx-1* 変異体を作成し、表皮形態形成に異常を示すことを明らかにした (Fujii et al., 2002, Liu et al., 2005)。さらに、*plx-1* 変異体の遺伝学的抑圧因子の検索を端緒として、セマフォリンシグナル下流で mTOR 系が制御され、mRNA タンパク質翻訳が調節されることを明らかにしてきた (Nukazuka et al., 2008, 2011)。

膜動態を対象とする本研究も *plx-1* 変異体の遺伝学的抑圧因子の研究から始まる。研究開始時点で *unc-41/stonin2* 変異の複数のアリルが *plx-1* 変異体の Ray 表現型 (ray1 位置異常) を抑圧することを見出していた。線虫および脊椎動物を含む他の動物において *UNC-41/stonin2* は *SNT-1/synaptotagimne1* と相互作用し、神経細胞でのシナプス小胞の開口放出・リサイクリングを調節することが知られている。そこで *snt-1/synaptotagimne1* 遺伝子変異の効果についても検討した結果、*snt-1* の複数のアリルが *plx-1* 変異体の Ray 表現型を抑圧することが

わかった。このことから、セマフォリンシグナルが *synaptotagmin1/stonin2* 系を制御して、細胞形態を調節する可能性が示唆された。さらに、*snt-1* が表皮細胞である Ray 前駆細胞で実際に機能しているのかどうか、確認するために、*SNT-1::mCherry* を Ray 前駆細胞に発現させた。*snt-1* 変異体での *SNT-1::mCherry* 発現は *plx-1* 変異に対する抑圧を救済したことから、*snt-1* が Ray 前駆細胞で細胞自律的に働くことが明らかになった。これまでシナプス小胞動態の制御因子として知られる *SNT-1/synaptotagimne1* が、表皮細胞での働くという報告はなく、またセマフォリンシグナルとシナプトタグミンの関係については全く知られていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では上記の遺伝学的な実験結果を受けて、セマフォリンシグナルによるエンドサイトシスを含む膜動態制御の可能性をさらに細胞生物学的に探った。実際にセマフォリンシグナルが *SNT-1/synaptotagimne1*・*UNC-41/stonin2* が関わる小胞動態、特にエンドサイトシスを制御するかどうかを証明することを一つの目標とした。また、セマフォリンシグナル下流の更なる解明のために全ゲノムを対象として RNAi ライブラリーを用いたサブレッサー検索をおこなった。

## 3. 研究の方法

(1)線虫 *C. elegans* 雄尾部の表皮細胞由来の感覚器である ray1 の位置を指標に、エンドサイトシス因子・エクソサイトシス因子遺伝子変異のプレキシン変異体表現型に対する影響を調べた。

(2)細胞内小器官マーカーを用いた ray 表皮細胞内での *SNT-1* 局在解析を行い、野生型とプレキシン変異体で比較した。

(3)幼虫雄尾部の体腔への脂溶性蛍光色素 FM4-64 注入実験を行い色素の細胞内取り込みを指標とし、ray 表皮細胞によるエンドサイトシスの解析を行った。

(4)GCaMP をプローブとして、野生型とプレキシン変異体での ray 表皮細胞内  $Ca^{++}$  レベルの評価を試みた。

(5)GeneService 社の RNAi Chromosome Set (I, II, III, IV, V, X) library (Ahringer et al., Genome Biology 2000) に含まれる約 1 万 6 千クローン全てを対象としたプレキシン変異体表現型の抑圧因子スクリーニングを Feeding RNAi 法によって行った。

## 4. 研究成果

**膜動態とセマフォリンシグナルとの関係解明**  
**エンドサイトシス・エクソサイトシス因子変異体を用いた解析**

snt-1, unc-41 変異だけでなく、一般的なエンドサイトシス因子である UNC-57/endophilinB, UNC-26/synaptojanin の各変異がセマフォリンシグナル変異体の尾部形態異常表現型を抑圧することがわかった。また、シナプス小胞の開口分泌制御因子 UNC-18/MUNC-18 の変異でも抑圧がみられた。神経細胞ではシナプトタグミンはエキソサイトシスとエンドサイトシスを合わせたシナプス小胞リサイクリングを制御すると考えられている。エンドサイトシス因子だけでなくエキソサイトシス因子の変異でも抑圧がかかる場合があることは、セマフォリンシグナルが ray 表皮細胞で SNT-1/UNC-41 系が関わる小胞リサイクリングの制御に関わる可能性を示唆している。

#### 細胞内小器官マーカーを用いた SNT-1 細胞内輸送の解析

膜動態解析ではセマフォリンによる synaptotagmin 1/stonin2 系制御の実態を解析するため、まず、*C. elegans* で細胞膜小胞系の局在マーカーとして実績のある以下の因子と蛍光蛋白質(GFP との)融合蛋白質を lin-17p 制御下で発現する形質転換系統を作成し SNT-1 の局在を検討した。endosome (RAB-8), early endosome (RAB-5) recycling endosome, (Rab-11), late endosome (RAB-7), ER (TRAM-1), Golgi body (GOS-28 および SYX-16), Lysosome (LMP-1)。GOS-28 以外では ray 表皮細胞内で GFP 発現が認められた。一部の SNT-1 は RAB-7 および LMP-1 との共局在が認められ、さらに野生型に比べプレキシシン変異体ではこの共局在性が低下することが明らかになった。

以上の結果から野生型では SNT-1 の late endosome/ lysosome へ輸送が上昇しているのではないかと考え、SNT-1 の輸送過程をライブイメージングによってより詳細に調べた。ニポウディスク型共焦点顕微鏡を用いて ray 表皮細胞内での SNT-1::mCherry の蛍光シグナルを経時的に追ったところ、プレキシシン変異体では蛍光顆粒はほとんど動きが見られなかったが、野生型では 10% 程度の蛍光顆粒が 1.5  $\mu\text{m}/\text{sec}$  の速度で移動していた。この移動は tubulin  $\beta$ -subunitno RNAi で見られなくなることから、微小管依存的な小胞輸送系によって、SNT-1 が分解経路へ運ばれている過程を反映しているものと思われる。

#### エンドサイトシスの解析

初期エンドソームマーカーである HGRS-1/Hrs1 は過去の *C. elegans* 研究においてエンドサイトシスの指標として用いられている (Lei et al., 2014)。蛍光タンパク質で標識した HGRS-1 を ray 前駆表皮細胞で発

現する系統を作成したところ、プレキシシン変異体での蛍光シグナルは野生型個体に比べ増加しており、またこの増加は unc-41 に対する RNAi によって抑圧された。また、エキソサイトシスに関わる SNB-1/synapto brevin を蛍光タンパク質で標識して ray 前駆表皮細胞で発現させたところ、mCherry::PH (PLC $\delta$ 1 の PH 領域を mCherry 標識した細胞膜マーカー)との共局在はプレキシシン変異体で野生型個体に比べ増加していた。これらの結果はプレキシシン変異体でのエンドサイトシス・エキソサイトシスの上昇を示唆している。

endocytosis/exocytosis をより直接的にモニターするために、当初の計画に従って SNT-1:: SEP/pHluorin2 を作成し線虫個体に導入したが、蛍光シグナルがみられず、これが利用できないことがわかった。そこで他の方法を模索し、microinjection 法によって幼虫雄尾部の体腔に脂溶性蛍光色素 FM4-64 を注入すると、即時に体腔に面した細胞の細胞膜が蛍光標識され、さらに時間がたつとともに一部の細胞内にも蛍光が検出されるようになることを見出した。そこで、この蛍光色素の細胞内取り込みを ray 表皮細胞によるエンドサイトシスの指標として利用することにした。

その結果、野生型 3 齢幼虫では ray 前駆表皮細胞内への色素の取り込みが見られずエンドサイトシスがほとんど起きていないことがわかった。一方プレキシシン変異体では 3 齢幼虫で色素が取り込まれた。snt-1/シナプトタグミン変異 および unc-41/ストーニン 2 変異の存在下ではプレキシシン変異体 3 齢幼虫での色素の取り込みは見られなかった。このことはプレキシシン変異体で SNT-1/UNC-41 依存性のエンドサイトシスが起きていることを示している。一方、4 齢幼虫ではプレキシシン変異体だけでなく野生型でも色素が取り込まれた。unc-41/ストーニン 2 変異体では、4 齢幼虫でも色素の取り込みは見られなかった。以上の結果から、ray-前駆表皮細胞には SNT-1/UNC-41 依存性のエンドサイトシスを行う能力が具わっており、セマフォリンシグナルは 3 齢幼虫期特異的にこのエンドサイトシスを抑制すると考えられる。

#### Ca<sup>++</sup>レベル測定の試み

以上の結果からセマフォリンシグナルが SNT-1/UNC-41 によるエンドサイトシス(と、おそらく小胞リサイクリング)を抑制的に制御しているという当初の仮説を裏付ける直接的な証拠が得られた。制御機構の一つの可能性としてセマフォリンシグナルによる Ca<sup>++</sup>シグナル調節が考えられる。そこで ray 表皮細胞内の Ca<sup>++</sup>濃度をモニタリングすることを試みた。通常の GCaMP ではほとんどシグナル

が見られなかった。

そこで線虫細胞での ER からの Ca<sup>++</sup> 放出を高感度で検出するために新規に開発された ER-targeted GCaMP を用いたカルシウムイメージングを行った。神経細胞において、神経活動に対応すると考えられる蛍光シグナルの変動が記録でき、プローブの有用性が確認できた。しかし、ray 前駆表皮細胞において野生型とプレキシン変異体との間でシグナルの差は検出できなかった。さらに高感度のプローブの開発が望まれる。

#### エンドサイトシス標的候補としての膜タンパク質の解析

エンドサイトシスは接着分子などの膜タンパク質の発現を制御することで細胞形態変化を引き起こす可能性がある。そこでセマフォリンシグナルによって調節されるエンドサイトシスによって制御される標的タンパク質を探るために、蛍光タンパク質を融合させた膜タンパク質 Frizzled, 接着因子カドヘリン (HMR-1)、接着装置構成タンパク質 AJM-1, の発現量・部位を観察したが、野生型とプレキシン変異体で違いが認められなかった。カドヘリン (HMR-1)GFP に対してレーザー共焦点顕微鏡下で個体中での FRAP を行い、野生型と変異体での定量的比較したが野生型と変異体で差が認められなかった。インテグリン (PAT-3) を蛍光蛋白質標識した系統では ray 表皮細胞で蛍光シグナルがほとんど認められなかった。以上、今回の研究ではエンドサイトシス標的を特定することはできなかった。

#### 今後の課題

今回の研究によってセマフォリンシグナルによって SNT-1/UNC-41 系を介した小胞動態の制御が行われていることが証明された。脊椎動物神経細胞ではセマフォリンはエンドサイトシスを促進するが、線虫表皮細胞では逆にセマフォリンが抑制的に働くことが明らかとなり、これまで知られていない制御機構が存在すると考えられる。現在、ここまでの成果をまとめた投稿論文を準備中である。

今後の課題として、セマフォリンによる小胞輸送制御の分子メカニズム解明を進める必要が挙げられる。今回の研究ではセマフォリンが Ca<sup>++</sup> を介して SNT-1/UNC-41 系を制御するかどうか明らかにできなかった。また、エンドサイトシスがどのように表皮細胞の形態を調節しているのかも解明すべき課題として残っている。

#### **RNAi ライブラリーを用いたサプレッサー検索によるセマフォリンシグナル関連因子の同定**

プレキシン雄変異体の尾部形態異常表現型の

抑圧を指標とした検索を行い、GeneService社の RNAi Chromosome Set (I, II, III, IV, V, X) library (Ahringer et al., Genome Biology 2000) に含まれる約 1万6千クローン全てを対象としたスクリーニングを完了させた。スクリーニングの結果、約 100 個の RNAi クローンによる処理で、プレキシン変異体では通常見られない野生型表現型を示す個体が 10% 以上出現した。これらクローンの原因遺伝子には代謝酵素や細胞膜タンパク質も含まれていた。

これまで私たちは遺伝子変異サプレッサー解析によりセマフォリンシグナル下流で mTOR シグナルを介した翻訳や小胞動態が制御されていることを明らかにしてきたが、今回の RNAi 検索の結果は、それ以外の未知のイベントも存在することを示している。ただし、本研究の結果、本来遺伝子に対応しない配列を含むクローンによる RNAi 処理でも、プレキシン変異体の雄尾部形態異常の表現型が抑圧されることが稀にはあるが観察されており、今後該当する遺伝子の変異を用いて抑圧を確認する作業が必要である。確実に抑圧効果が確認できた遺伝子に関して抑圧機構の詳細を解明することが今後の課題である。

#### 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 2件)

Niwa F, Sakuragi S, Kobayashi A, Takagi S, Oda Y, Bannai H, Mikoshiba K. Dissection of local Ca(2+) signals inside cytosol by ER-targeted Ca(2+) indicator. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 (2016);479(1):67-73. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.034.

Akira Nukazuka and Shin Takagi Characterizing Semaphorin Signaling in vivo using *C. elegans* Methods in Molecular Biology 査読有 1493, 485-498. (2017) DOI: 10.1007/978-1-4939-6448-2\_34

[学会発表](計 3件)

国際学会 ポスター

Analysis of morphological changes of epidermal cells producing sensory rays in the *C. elegans* male tail Shin Takagi, Hiroki Tanaka, Ayana Kobayashi *C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting. 2014/7/17 奈良

Possible regulation of endocytosis by

semaphorin during ray morphogenesis  
Ayana Kobayashi, Hiroki Tanaka, Shin Takagi  
C. elegans Development, Cell Biology and  
Gene Expression Meeting.  
2014/7/17 奈良

(4)研究協力者  
該当なし

国内学会

Analysis of morphological changes of  
epidermal cells producing sensory rays in  
the C. elegans male tail  
Shin Takagi, Hiroki Tanaka, Ayana  
Kobayashi  
日本発生物学会第46回大会 2014/5/28  
名古屋市 (ウインク名古屋)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/~zootwo/170313%20HP.htm>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高木 新 (TAKAGI Shin)  
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：90171420

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

井原 邦夫 (IHARA Kunio)  
名古屋大学・遺伝子実験施設・准教授  
研究者番号：90223297