

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440128

研究課題名(和文)細胞内輸送異常を細胞死へと変換するBNip1の機能解析

研究課題名(英文)ER-resident BH3-only protein, BNip1, induces apoptosis in response to excessive activation of vesicular transport in zebrafish photoreceptors

研究代表者

西脇 優子(Nishiwaki, Yuko)

沖縄科学技術大学院大学・神経発生ユニット・研究員

研究者番号：20360620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ゼブラフィッシュの  $\beta$ -SNAP変異体では、細胞内小胞輸送の異常が起きた時、小胞体上の蛋白であるBNip1を介して視細胞変性を引き起こされる事を報告した。正常な細胞ではBNip1は小胞体に存在し、syntaxin18-SNARE複合体の構成因子として細胞内輸送に関与する。本研究では、BNip1の細胞死誘導能が小胞体上で活性化されること、BNip1依存性の細胞死が視細胞外節形成時期と対応していること、視細胞内の小胞輸送を低減させると  $\beta$ -SNAP変異体の視細胞の細胞死が抑えられることを確認した。この結果は、BNip1依存性の細胞死は過剰な小胞輸送をモニターするというモデルを強く示唆する。

研究成果の概要(英文)：Zebrafish beta-SNAP mutants show photoreceptor apoptosis through the activation of a BH3-domain containing SNARE protein, BNip1. BNip1 is a target-SNARE component of syntaxin18 SNARE complex, which normally regulates retrograde transport from Golgi to endoplasmic reticulum(ER). In this study, I found that the depletion of beta-SNAP activates BNip1-dependent apoptosis in zebrafish photoreceptors only in the early developmental stage when intracellular protein transport to the outer segment is active. Furthermore, our data indicate that the inhibition of protein transport to the outer segment rescues photoreceptor apoptosis in the beta-SNAP mutant. From these data, we propose that BNip1 functions as a safe guard mechanism that inhibits excessive activation of vesicular transport during photoreceptor differentiation.

研究分野：発生生物学

キーワード：BNip1 細胞死誘導 小胞輸送

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内での小胞輸送の破綻は細胞死を引き起こす。我々は、小胞輸送の異常により視細胞変性を引き起こすゼブラフィッシュ突然変異体 (beta-SNAP 変異体) の解析を通し、小胞輸送を制御する SNARE 蛋白のひとつである BNip1 が、輸送小胞が標的膜に融合する過程に重要な役割を果たす SNAP タンパクの欠損によって起こる小胞輸送の異常を検出し、Bax 蛋白を介した細胞死 (アポトーシス) を誘導することを見出した。BNip1 は細胞死誘導に必要な BH3 ドメインを持っているがアポトーシス誘導活性は通常は低い。beta-SNAP 突然変異体では、小胞の融合後に形成された BNip1 を含む syntaxin18 SNARE 複合体 (通常、cis-SNARE 複合体と呼ばれる) が SNAP タンパクの枯渇のために解離されず、それに伴い BNip1 の BH3 ドメインが活性化されると、アポトーシスが誘導される。このことから、BNip1 は小胞の融合異常を感知して、細胞死を誘導する非常警報装置として機能すると考えられた。しかし、BNip1 依存性の細胞死が生体内のどのような局面で働く可能性があるかについては知見を得ていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、小胞輸送の破綻により、通常小胞体上に局在している BNip1 がどのようなステップを経て細胞死を誘導するシグナルを伝達するのか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした解析を行い、BNip1 依存性の細胞死が正常発生や恒常性の維持で働きうる可能性について検討した。

### 3. 研究の方法

研究を遂行するにあたって、以下の作業仮説に基づいて検証を行った。

BNip1 が細胞死を誘導するのは小胞体上で cis-SNARE 複合体を形成した状態で蓄積された時である。活性化された BNip1 の BH3 ドメ

インが Bcl2 等の抗アポトーシス蛋白と結合することにより、Bax を活性化させ、細胞死が起きる。小胞体上で cis-SNARE 複合体が分解できずに蓄積する状況として、小胞輸送が過剰に活性化することにより SNAP の枯渇が起こることが想定された。実際、beta-SNAP 変異体では、視細胞の変性が始まる時期と、外節の伸長が顕著になる時期が一致している。外節の伸長には小胞輸送が活性化することが必要である。もし、輸送の活性化が細胞死を引き起こすのであれば、輸送が緩やかに行われている時期、あるいは軽減された場合は細胞死誘導活性が抑えられると予想される。そこで本研究では、beta-SNAP 変異体にターゲットとなる蛋白を遺伝子導入で強制発現させる、あるいはモルフォリノなどを用いてロックダウンすることにより、視細胞変性の症状が抑制できるかを指標に検証を行った。

### 4. 研究成果

BNip1 の細胞死誘導能は、BNip1 を含む syntaxin18 cis-SNARE 複合体が形成されることで活性化される。通常小胞体上に局在する syntaxin18 cis-SNARE 複合体がどのような経路で Bax を介して細胞死を誘導するシグナルをミトコンドリアへ伝えるのかはまだ明らかでなかった。

本研究では、まず、BNip1 の細胞死誘導能が活性化されるのが、小胞体上であることを確認した。BNip1 により誘導される細胞死は抗アポトーシス蛋白の Bcl2 を強制発現することで抑制できる。我々のモデルでは、BNip1 は通常は分子内の coiled-coil ドメインにより細胞死誘導能を抑制されているが、小胞体上で cis-SNARE 複合体を形成した時に起きる立体構造の変化によって、BH3 ドメインが細胞死誘導能を持つと考えている。このモデルを検証するため、小胞体局在シグナルを付加した Bcl2 (ER-標的 Bcl2) を強制発現し、BNip1 が小胞体上で Bcl2 と相互作用する事で細胞

死を押さえる事が出来ることを示した。この結果から、BNip1 の細胞死誘導能が活性化された後、小胞体上での Bcl2 の枯渇がアポトーシスを誘導する最初のステップであることが明らかになった。

次に、BNip1 を含む cis-SNARE 複合体が小胞体上で蓄積する状況について検証を行った。ゼブラフィッシュ beta-SNAP 変異体の視細胞死は、小胞輸送が最も活発な時期である受精後 2~3 日目に集中して起こることから、小胞輸送の過剰活性化に反応して、BNip1 依存性の細胞死が誘導されると予想された。そこで、beta-SNAP をヒートショックプロモーターで発現させるトランスジェニック系統を確立し、このトランスジェニック系統を beta-SNAP 変異体に入れることで、BNip1 依存性の細胞死を抑制するために beta-SNAP が必要な時期を特定した。その結果、BNip1 依存性の細胞死を抑制するのに beta-SNAP が必要とされる時期が受精後 4 日目までであることを明らかにした。細胞死が始まる受精後 2 日目からこの時期までは視細胞外節の成長が著しく膜輸送が盛んに行われているため、この結果は BNip1 依存性の細胞死は過剰な輸送に対して感受性があるというモデルを強く示唆する。

生体内で動く細胞死誘導機構として新たに見つかった BNip1 を介した小胞輸送異常のアラーム機構は、最初の細胞死誘導能活性化が小胞体上で起きていることが意義深い。BNip1 依存性の細胞死で考えられる過剰輸送とは逆に、小胞輸送の停滞により細胞死を引き起こす機構として、小胞体ストレス応答が考えられる。輸送が停滞することでタンパク質が異所的に小胞体に蓄積し、細胞死が誘導される。この観点から見ると、BNip1 依存性の細胞死誘導機構と小胞体ストレス応答は、小胞体からの順行輸送スピードの上限と下限をモニターする小胞輸送異常のアラーム機構として協調して働いている可能性が示

唆される。

一方、視細胞でのタンパク質輸送の破綻は、視細胞変性を引き起こし失明に至る。様々な原因遺伝子が同定されているが、細胞死に至る経路についてはまだ未知な部分も多い。タンパク質の輸送が停滞した場合としては、変異ロドプシンが小胞体に蓄積して起きる小胞体ストレス応答などが報告されているが、過剰な輸送についてはまだ知見がない。今後は、BNip1 依存性の細胞死と小胞体ストレス応答から誘導される細胞死の機構が、視細胞の恒常性維持にどの様に関与しているかを調べていきたい。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Y. Nishiwaki, et. al.  
Molecular Mechanism that Converts Vesicular Fusion Defects into Apoptosis in Photoreceptors  
Gordon Research Seminar - Visual System Development (25 May 2014, Italy)
- ② Y. Nishiwaki, et. al.  
Molecular Mechanism that Converts Vesicular Fusion Defects into Apoptosis in Photoreceptors  
11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics (26 June 2014, USA)
- ③ 西脇優子、他  
小胞体局在型 Bcl2 の過剰発現は BNip1 が誘導する細胞死を抑制する  
第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 27 日、横浜)
- ④ Y. Nishiwaki, et. al.  
Molecular Mechanism that Converts Vesicular Fusion Defects into Apoptosis in Photoreceptors  
The 9th European Zebrafish Meeting, (30 June, 2015, Oslo, Norway)
- ⑤ Y. Nishiwaki, et. al.  
Mechanism that links vesicular fusion defects and apoptosis in photoreceptors  
JSDB Special Symposium: Frontier of Developmental Biology Hosted by JSDB, (2 June, 2016, Tokyo)

- ⑥ Y. Nishiwaki, et. al.  
Mechanism that links vesicular fusion defects and apoptosis in photoreceptors  
The Allied Genetics 2016 Conference, (14-16 July, 2016, Orland, USA)
- ⑦ 西脇優子、他  
小胞輸送障害が引き起こす視細胞変性の機構  
第39回日本神経科学学会年会(2016年7月20日、横浜)
- ⑧ Y. Nishiwaki, et. al.  
ER-resident BH3-only protein, BNip1, induces apoptosis in response to excessive activation of vesicular transport in zebrafish photoreceptors. RD2016 (20 September, 2016, Kyoto)
- ⑨ Y. Nishiwaki, et. al.  
An ER-resident BH3-only protein, BNip1, induces apoptosis in response to excessive vesicular transport during photoreceptor differentiation  
RD2016 (27 September, 2016, Tokyo)
- ⑩ Y. Nishiwaki, et. al.  
Mechanism that links vesicular fusion defects and apoptosis in photoreceptors  
第39回日本分子生物学会年会(2014年11月30日、横浜)

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西脇 優子 (NISHIWAKI, Yuko)

沖縄科学技術大学院大学・神経発生ユニット・リサーチサイエンティスト  
研究者番号：20360620

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
政井一郎 (MASAI, Ichiro)  
沖縄科学技術大学院大学・神経発生ユニット・准教授  
研究者番号：50242087

(4) 研究協力者  
なし