

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07050

研究課題名(和文) ショウジョウバエ視細胞における側底面膜への膜タンパク質の選別輸送の分子機構の解明

研究課題名(英文) Crag/Rab10/Ehbp1 regulate the basolateral transport of Na+K+ATPase in Drosophila photoreceptors

研究代表者

佐藤 明子 (Sato, Akiko)

広島大学・総合科学研究科・准教授

研究者番号：30529037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の体を構成する細胞の多くは極性を持っている。このような細胞構造を作成し維持するためには膜タンパク質を選別して適切な細胞膜ドメイン(極)へと送る輸送(極性輸送)が必要だが、その分子機構はよく分かっていない。側底面膜への極性輸送については哺乳類上皮細胞を用いた解析からAP1、クラスリンが関与することが分かっていた。本研究では、明瞭に分極化したショウジョウバエ視細胞を用いて、AP1、クラスリンに加えてCrag、Rab10、Ehbp1が側底面膜への輸送されるNa+K+ATPaseのトランスゴルジ網からの出芽に必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物の体を構成する細胞の多くは極性を持っている。このような細胞構造を作成し維持するためには膜タンパク質を選別して適切な細胞膜ドメイン(極)へと送る輸送(極性輸送)が必要だが、その分子機構はよく分かっていない。側底面膜への極性輸送については哺乳類上皮細胞を用いた解析からAP1、クラスリンが関与することが分かっていた。本研究では、明瞭に分極化したショウジョウバエ視細胞を用いて、AP1、クラスリンに加えてCrag、Rab10、Ehbp1が側底面膜への輸送されるNa+K+ATPaseのトランスゴルジ網からの出芽に必要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Polarized membrane trafficking is essential for the construction and maintenance of multiple plasma membrane domains in the cell. The highly polarized Drosophila photoreceptor is an excellent model for studying polarized transport. A single cross-section of the Drosophila retina contains many photoreceptors with three clearly differentiated plasma membrane domains: a rhabdomere, a stalk, and a basolateral membrane. Here, we showed that impairment of Crag/Rab10/Ehbp1 mislocalizes the basolateral protein marker Na+K+ATPase to the apical membrane and stalk membrane, shrinks the basolateral membrane, elongates the stalk membrane, and causes abnormalities in the Golgi cisternae. The phenotypic similarity of the deficiencies and colocalization between AP1/clathrin and Crag/Rab10/Ehbp1 suggest that Crag/Rab10/Ehbp1 regulates the budding process in basolateral transport within photoreceptors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：側底面 極性輸送 ショウジョウバエ 視細胞 Na+K+ATPase トランスゴルジ網

1. 研究開始当初の背景

膜蛋白質の小胞輸送の分子機構は、これまで培養細胞や酵母を用いて活発に研究され、多くの知見が得られてきた。しかし、多細胞生物の体を構成する細胞の多くは、多方向性で調節性の小胞輸送機構を持っており、それにより複雑で多様な細胞形態を形成することで高次な機能を実現しているが、このような膜タンパク質の選別輸送(極性輸送)の分子機構は、まだよく分かっていない。このような極性輸送の研究は、高等動物や植物中に *in situ* に存在する細胞を用いる必要がある。近年、極性輸送の欠損が様々な疾患をもたらすことが理解されるようになったことから、高等動物・植物を用いた膜輸送システムの研究が、世界的に盛んになってきた。

我々の研究グループではショウジョウバエ網膜を用いて極性輸送機構の研究に取り組んできた(図1)。ショウジョウバエ視細胞は、頂端面の一部が増幅した光受容膜・その周辺のストーク膜・側底面膜・軸索とシナプスという少なくとも4つの明瞭に分極化した細胞膜

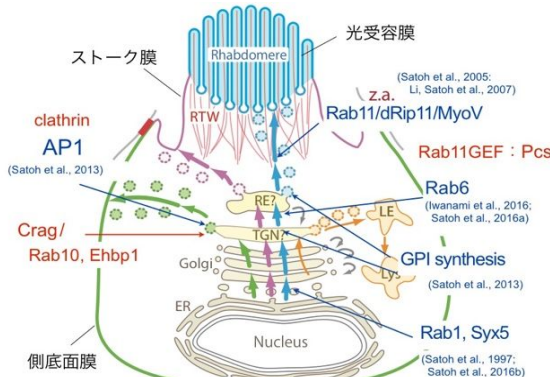


図1 ショウジョウバエ視細胞における3つの膜ドメインへの極性輸送研究

区画を持つ。これまで光受容膜に特異的に輸送されるロドプシンをモデルとして光受容膜への選別輸送機構を研究し、Rab1, Syx5, TRAPP がロドプシンの小胞体からゴルジ体への輸送に(Sato et al.,1997; Sato et al.,2016; Otsuka et al., in preparation)、Rab11/dRip11/MyoV 蛋白質複合体がポストゴルジ小胞の光受容膜基部への輸送に(Sato et al.,2005,Li et al.,2007)、GPI 生合成がトランスゴルジ網における膜タンパク質の選別に必要なこと(Sato et al, 2013)を明らかにしてきた。更に最近、Rab6 が側底面への輸送にはかかわらず、2つの頂端面への輸送

に關与することを見出し、多方向へ送られる膜タンパク質の選別が段階的に起こることを明らかにした(Iwanami et al., 2016)。

2. 研究の目的

本研究では、側底面膜への極性輸送の分子機構の解明を目指す(図1)。側底面膜への極性輸送については哺乳類の上皮細胞を用いた解析が進んでおり、既に AP1B, クラスリンが關与することが分かっている。我々の研究グループではショウジョウバエで唯一の AP1 の欠損変異細胞の解析により、視細胞における側底面膜への極性輸送に AP1 が必須であることを示した(Sato et al, 2013)。Crag 変異細胞では、蛹期のロドプシン輸送は正常だが、成虫期の強い光刺激でロドプシンを含むポストゴルジ小胞の輸送が阻害されると報告された(Xiong et al., 2012)。そこで我々は、ロドプシン輸送研究の一環として、この実験の追試を試みた。Xiong らは、ロドプシンと F-actin により組織を観察したが、私達はロドプシンと Na+K+ATPase の染色を行った。その結果、報告されてい

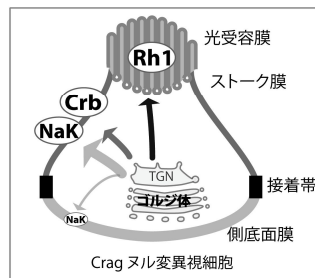
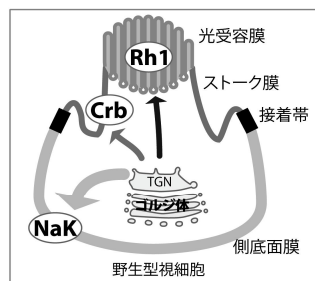


図2 Crag ヌル変異細胞における Na+K+ATPase の誤った輸送

ない事実として、蛹期の Crag 変異視細胞ではロドプシン輸送は正常だが Na+K+ATPase の側底面膜への輸送が著しく減少すること、Na+K+ATPase の一部がストーク膜へ異所的に輸送されること、さらに側底面膜の面積が著しく減少することを見出した

(図2)。強い光条件下においた成虫でロドプシンを含むポストゴルジ小胞の輸送が阻害されるのは、側底面膜に存在する Na+K+ATPase が少ない Crag 変異細胞では光刺激による脱分極を分極化状態に戻せないため、様々な輸送が正常に起こらなくなる可能性が考えられる。

哺乳類の Crag ホモログである DENN4D は Rab10 を活性化することでインシュリン投与による GLUT4 のトランスロケーションに必要であることが報告されている (Sano et al.,

2011)。ショウジョウバエでは上記報告以外に、卵巣の濾胞細胞で基底膜成分(コラーゲンなどの細胞外基質タンパク質)の側底面膜からの分泌に特異的に関わり、側底面膜への一般的な極性輸送には関与しないと報告されている(Denef et al., 2008)。一方、我々の観察した Crag 欠損による側底面膜への Na+K+ATPase の輸送の阻害・ストーク膜への異所的な輸送・側底面膜面積の減少は、AP1 欠損変異細胞の表現型に類似しているがさらに著しく、Crag が視細胞において一般的な極性輸送に直接・間接的に関与することは疑いない。濾胞細胞における基底膜成分の側底面膜からの分泌には Crag のみならず、Crag が活性化する Rab10、Rab10 エフェクター Ehb1 が関与することが報告されている(Lerner et al., 2013; Isabella et al., 2016)。本研究では Crag に加え Rab10、Ehb1 が側底面膜輸送一般に必要な因子であるかを解析し、側底面膜輸送の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究の結果に盛り込んで書くこととする。

4. 研究成果

1) Crag, Rab10, Ehb1 は Na+K+ATPase の側底面膜への輸送に必要である

Crag のヌル変異体はすでに研究室で保持しており、Ehb1 のヌル変異体細胞は、Hugo Bellen 博士の研究室に分与いただいた。この2つの変異体は致死性であるが、これらのヌル変異は対応する FRT を動原体側に保持するため FLP/FRT システムを用いてモザイク組織の作成が可能である。網膜時的に FLP を発現する eyFLP と組み合わせると、網膜にホモ接合体のヌル変異細胞を作成し観察できる。この方法により Crag, Ehb1 のヌル変異細胞をモザイク状に作成し、その表現型を隣り合って存在する野生型細胞と比較した。Crag 変異細胞については目的でのべたが、Ehb1 変異細胞についても、側底面の Na+K+ATPase 減少すること、Na+K+ATPase の一部がストーク膜へ異所的に輸送されることがわかった。Crag, Ehb1 のヌル変異細胞の表現型を定量化するために、共焦点レーザー顕微鏡で染色された側底面膜・ストーク膜の長さを測定した。その結果、Crag, Ehb1 変異

変異細胞の側底面の長さは、野生型細胞の側底面との長さの 0.77, 0.75 倍に減少し、Crag, Ehb1 変異細胞のストーク膜の長さは、野生型細胞のストーク膜の長さの 1.41, 1.43 倍に増加していた。電子顕微鏡による解析でも同様に、その結果、Crag, Ehb1 変異細胞の側底面の長さは、野生型細胞の側底面との長さの 0.58, 0.57 倍に減少し、Crag, Ehb1 変異細胞のストーク膜の長さは、野生型細胞のストーク膜の長さの 1.79, 1.71 倍に増加していた。変化率が電子顕微鏡による測定のほうが大きくなるのは、膜が入り組んだ構造をしている場合に、膜の長さをより正確に測定できるためと考えられた。

Rab10 についてはヌル変異体を作成し、モザイク網膜の作成を試みたが、細胞致死性が著しく高く、ヌル変異細胞が全く得られなかった。そこで、Rab10 ドミナントネガティブ変異体 Rab10T23N を網膜で発現するトランスジェニックバエを作成し解析を行った。その結果、Rab10T23N 発現細胞についても、側底面の Na+K+ATPase 減少すること、Na+K+ATPase の一部がストーク膜へ異所的に輸送されることがわかった。さらに、側底面とストーク膜の長さの定量を行なった。共焦点レーザー顕微鏡における解析では、Crag, Ehb1 変異細胞と同様に、Rab10T23N 発現視細胞の側底面の長さは、野生型細胞の側底面との長さの 0.7 倍に減少し、Rab10T23N 発現視細胞のストーク膜の長さは、野生型細胞のストーク膜の長さの 1.58 倍に増加していた。さらに電子顕微鏡による解析では、Rab10T23N 発現視細胞の側底面の長さは、野生型細胞の側底面との長さの 0.65 倍に減少し、Rab10T23N 発現視細胞のストーク膜の長さは、野生型細胞のストーク膜の長さの 1.57 倍に増加していた。これらの結果から、Crag, Rab10, Ehb1 はいずれもショウジョウバエ視細胞において Na+K+ATPase の側底面膜への輸送に必要であることが分かった。

Rab10T23N は網膜のすべての細胞で発現させたので、モザイククローンを形成する Crag, Ehb1 と異なり、免疫プロット用の網膜サンプルを作成できる。そこで、Rab10T23N 発現網膜と野生型網膜の抽出液を作成し、イミ

ユノプロット法により Na+K+ATPase のたんぱく質量を定量化した。Na+K+ATPase は 2 量体からなるので、各々のサブユニットに対する抗体を用いて、両サブユニットを定量した。その結果、Rab10T23N 発現網膜では サブユニットは各々野生型網膜の 48%、54%まで減少していた。さらに、Na+K+ATPase の減少のメカニズムを知るために、Rab10T23N とともにリソソームへの輸送を阻害する Rab7T22N を網膜で発現させて Na+K+ATPase の局在を観察した所、後期エンドソームの 1 種である多胞体に Na+K+ATPase が蓄積していた。この結果から、Rab10 機能欠損細胞では、側底面膜への輸送が阻害された Na+K+ATPase はストーク膜に輸送されるだけでなく、後期エンドソームに運ばれ、最終的にはリソソームによって分解されることが分かった。

2) Crag, Ehbp1 はトランスゴルジ網(TGN)に局在する

Crag, Rab10 に対する抗体は作成を試みたが、組織で抗原を認識できる抗体を作成出来なかったため、FLAG::Crag, Myc::Rab10 を発現するトランスジェニックバエを作成し解析を行った。Crag, Rab10, Ehbp1 はいずれもゴルジ体に局在した。ゴルジ体内部での局在をより詳細に解析した所、Rab10 がシスゴルジ嚢からトランスゴルジ嚢、TGN に至るまで広くゴルジ体に分布するのに対して、Crag, Ehbp1 はいずれも TGN に特異的に局在した。Crag と Ehbp1 では、Crag の方がよりシス側の分布を示した。この局在結果は、ゴルジ体に広く分布する Rab10 を Crag が TGN において特異的に活性化し、Crag により活性化した Rab10 が Ehbp1 を細胞質から TGN にリクルートすることを示唆している。

3) AP1, クラスリンの解析

AP1B, クラスリンは、ともに哺乳類で側底面膜への輸送に関わることが示されている。ハエの視細胞においても AP1 欠損が側底面膜への Na+K+ATPase の輸送の阻害・ストーク膜への異所的な輸送が起こることを我々は以前に報告している (Sato et al., 2013)。しかしながら、AP1 変異体について本研究のような定量的解析は行っていなかった。また、クラスリンに関しては、ハエで側底面への輸送

の研究は全く行われていない。そこで、クラスリンの RNAi コンストラクトをモザイク状に発現する網膜を作成し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行なった。その結果、側底面膜への Na+K+ATPase の輸送の阻害・ストーク膜への異所的な輸送が起こることがわかった。しかし、側底面輸送の欠損に加え、細胞の頂底極性の乱れが観察され、側底面膜とストーク膜の長さの測定が困難であった。ただし、ストーク膜の長さに野生型と比較して大きな違いがあるようには見えなかった。2 種類の AP1 (AP1^Δ, AP1^μ) 部分欠損変異体についても観察を行った所、いずれの変異体においても側底面膜への Na+K+ATPase の輸送の阻害・ストーク膜への異所的な輸送が再現されたが、その内の 1 つの変異体 (AP1^Δ) では同時に細胞の頂底極性の乱れが観察された。AP1 変異体については、頂底極性の乱れは、クラスリン欠損ほどはひどくなかったため、AP1^Δ, AP1^μ の両変異体について側底面膜とストーク膜の長さを定量した。その結果、AP1^Δ, AP1^μ 部分欠損変異細胞では側底面の長さは、野生型細胞の側底面との長さの 0.82, 0.94 倍に減少し、AP1^Δ, AP1^μ 部分欠損変異細胞のストーク膜の長さは、野生型細胞のストーク膜の長さの 1.24, 1.25 倍に増加していた。AP1^μ 部分欠損変異細胞における側底面膜とストーク膜の長さの変化は、Crag, Rab10, Ehbp1 と比較して小さいが、より大きな頂底極性を示すことから、AP1B, クラスリンは側底面膜への輸送に加え、頂底極性制御に関わる可能性が示唆された。

4) AP1, クラスリンと Crag, Ehbp1 は TGN において共局在する。

次に、AP1, クラスリンの局在を検討した所、哺乳類での報告と一致して TGN に局在することがわかった。さらに、AP1, クラスリン, Crag, Ehbp1 の局在を比較検討した所、これら 4 つのタンパク質はいずれも Rab11 よりもシス側で Rab6 と共局在することがわかった。つまり、これら 4 つのタンパク質は、TGN で共局在することがわかった。

AP1, クラスリンは小胞の出芽に機能することが分かっている。本研究結果は、Crag, Rab10, Ehbp1 がショウジョウバエ視細胞において、AP1, クラスリンと共に Na+K+ATPase の側底面膜への輸送、特に TGN からの小胞の形成の段階に必要であることを示している。

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) Yuka Ochi*, Yuri Nakamura*, Takunori Satoh and Akiko K. Satoh. (*: contribute equally) Crag/Rab10/Ehbp1 regulate the basolateral transport of Na⁺K⁺ATPase in *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Science* 133, jcs238790.

〔学会発表〕(計2件)

- 1) Akiko K. Satoh. Polarized transport in *Drosophila* photoreceptors. 第95回日本生理学会 生理学会・解剖学会合同シンポジウム”Molecular mechanisms of cell polarity formation” 2018年3月28日(高松)
- 2) Yuka Ochi*, Yuri Nakamura*, Takunori Satoh and Akiko K. Satoh. Crag/Rab10/Ehbp1 regulate the basolateral transport of Na⁺K⁺ATPase in *Drosophila* photoreceptors. 第51回日本発生活物学会合同会・第70回日本細胞生物学会 2018年6月28日(高松)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕(計1件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 明子 (Satoh, Akiko)
広島大学・総合科学研究科・准教授
研究者番号 30529037