

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19590066

研究課題名(和文)オルガネラ異常を引き起こす線虫 ABC 輸送体の生理機能の研究

研究課題名(英文) Physiological aspects of HAF-4 and HAF-9, *C. elegans* ABC transporters, which cause abnormal formation of lysosome-related organelle.

研究代表者

大橋 綾子(小林 綾子)(OHASHI AYAKO)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：90272484

研究成果の概要(和文)：TAP-like (TAPL; ABCB9) はリソソームに局在し、細胞質からリソソームにペプチドを運搬すると推測されているハーフタイプの ATP 結合カセット (ABC) 輸送体であるが、その生理機能は依然として不明である。研究代表者らは、ゲノムデータベースの比較により、TAPL が単純なモデル生物である線虫 *C. elegans* から哺乳類まで様々な種で保存されていることを明らかにした。本研究では、これらの生体内機能を解明するために、線虫の TAPL ホモログである HAF-4 と HAF-9 の発現部位やこれらの遺伝子欠損変異体の表現型の解析を行った。緑色蛍光蛋白質 (GFP) で標識した HAF-4 と HAF-9 は共に、幼虫期から成虫期にかけて、非酸性ながら、リソソーム膜蛋白質 (LAMP) のホモログ LMP-1 陽性の腸内顆粒の膜に局在していた。*haf-4* や *haf-9* の変異体では、幼虫後期から成虫の早期にかけて腸細胞内の顆粒の欠失が認められた他、産卵数の減少、排泄周期の長期化、成長遅延の表現型を示した。更に、腸内顆粒の表現型は、GFP 標識した野生型蛋白質の過剰発現でレスキューされたが、ATP 非結合型の HAF-4 ではレスキューされなかった。以上の結果は、輸送体 HAF-4 と HAF-9 が、腸内顆粒の形成や他の生理的局面に関与することを示している。

研究成果の概要(英文)：TAP-like (TAPL; ABCB9) is a half-type ATP-binding cassette (ABC) transporter that localizes in lysosome and putatively conveys peptides from cytosol to lysosome. However, the physiological role of this transporter remains to be elucidated. Comparison of genome databases reveals that TAPL is conserved in various species from a simple model organism, *Caenorhabditis elegans*, to mammals. *C. elegans* possesses homologous TAPL genes: *haf-4* and *haf-9*. In this study, we examined the tissue-specific expression of these two genes and analyzed the phenotypes of the loss-of-function mutants for *haf-4* and *haf-9* to elucidate the in vivo function of these genes. Both HAF-4 and HAF-9 tagged with green fluorescent protein (GFP) were mainly localized on the membrane of nonacidic but lysosome-associated membrane protein homologue (LMP-1)-positive intestinal granules from larval to adult stage. The mutants for *haf-4* and *haf-9* exhibited granular defects in late larval and young adult intestinal cells, associated with decreased brood size, prolonged defecation cycle, and slow growth. The intestinal granular phenotype was rescued by the overexpression of the GFP-tagged wild-type protein, but not by the ATP-unbound form of HAF-4. These results demonstrate that two ABC transporters, HAF-4 and HAF-9, are related to intestinal granular formation and some other physiological aspects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	0	0	0
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

2008年度は交付申請留保のため補助金配分なし。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：トランスポーター、オルガネラ、生理機能、線虫

1. 研究開始当初の背景

細胞内ペプチド輸送体は、タンパク質・ペプチドの動態制御に関わる分子として、将来、薬学領域でもその重要性が増すと期待されている。研究代表者らがヒトやマウスに見いだしたTAPL (TAP-Like) は、抗原ペプチドを輸送するTAP (Transporter associated with antigen processing) との遺伝子構造の類似性から命名された膜蛋白質で、ヒトのABC (ATP binding cassette) 輸送体の分類では、多剤耐性遺伝子MDR (multidrug resistance) やTAP の属するBサブファミリーの新メンバー (ABC9) である (Kobayashi A et al. (2000))。TAPLは抗原提示・薬物排出・老化やストレスで生じた老廃物の処理・生理活性分子の分泌や活性化などとの関連から極めて興味深い輸送体蛋白である。薬物排出活性への影響 (Ohashi-Kobayashi A et al. (2006)) や無細胞系でのペプチド輸送活性は示された (Wolters JC et al. (2005)) もの、その生理機能は未明のままであった。

研究代表者は、本研究課題の準備段階として、獲得免疫を持たないモデル生物・線虫にTAPL ホモログが存在することを見いだしていた。そして、予備的実験により、(1) TAPL 線虫ホモログが腸管の細胞内顆粒に主として発現すること、(2) その遺伝子の欠損変異体ではある種の腸内顆粒が消失するオルガネラ異常を示すこと、更に(3) 成長遅延やバイオリズムの異常等が見られること、を発見した。これらは、この輸送体による個体レベルの形質を初めて示したものである。

近年、国内外で線虫を題材とした細胞内の物質輸送・代謝の研究は注目されている。しかし、物質代謝の解析系のモデルとして線虫を利用した研究を調べると、脂質に関しては脂質貯蔵に関する新規遺伝子が線虫から発見され、そのヒトホモログの機能解明に繋がった (Mackey RM et al. (2003)) が、ペプチド・蛋白に関する報告はない。腸細胞内顆粒に着目した報告例も二例のみであった。その一つの自家蛍光顆粒が減少する変異体 *glo-1* (Hermann GJ et al. (2005)) は、我々の注目する非酸性腸内顆粒とは違う顆粒の欠損であった。自家蛍光顆粒は酸性であることからリソソームと以前は断定されていたが、色素沈着の特徴からメラノソームなどリソソーム関連オルガネラの一つと思われる。もう一つは、LAMP (Lysosome-associated membrane protein) の線虫ホモログ *Imp-1* の変異体で、TAPL ホモログと同じ非酸性顆粒の減少が唯一報告されていた (Kostich M et al. (2000))。このようにリソソーム機能に関連した線虫

の腸内顆粒は複数種あると予想され、研究開始段階では、国内外の線虫研究者と協力し、腸細胞のオルガネラの構成成分や形態・機能を調べるためのツール作りから始めている状況にあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「線虫腸内リソソーム様顆粒の形成・機能・調節機構とABC輸送体HAF-4, HAF-9の関連を解明すること」である。線虫の腸は、哺乳類でみられるような消化吸収の器官としての機能だけでなく、ペプチドホルモン産生・生殖腺への栄養供給・毒物の排出・病原体への生体防御などの多機能な器官であり、様々な高次の生命現象に重要な役割を担うと考えられるが、その分子機構の解明は遅れている。このような生命現象を理解する分子基盤を構築するために、腸内顆粒の変化を一つの指標として活用する。その第一歩として、線虫における2つのTAPLホモログ (HAF-4, HAF-9) のについて、(1) 腸細胞内での発現と(2) リソソーム様オルガネラ形成における役割を明らかにし、更に(3) 注目する腸内顆粒の特徴を解析することとした。

3. 研究の方法

(1) 線虫ABC輸送体HAF-4, HAF-9の腸細胞における細胞内局在解析

HAF-4もしくはHAF-9のゲノム遺伝子にin frameでGFP遺伝子をつないだコンストラクトを作成し、それぞれ線虫に遺伝子導入することで、own promoterの制御下にGFP融合型HAF-4 (以下HAF-4::GFPと表記する) もしくはGFP融合型HAF-9 (以下HAF-9::GFPと表記する) を発現させた。

これらのトランスジェニック線虫におけるGFPの蛍光を蛍光顕微鏡下で解析することにより、HAF-4, HAF-9の腸細胞における発現とその細胞内局在を同定した。

HAF-4とHAF-9の腸細胞内の共局在に関しては、まずHAF-9::GFPのGFPの代わりに赤色蛍光タンパクmCherryをつなげた、mCherry融合型HAF-9 (以下HAF-9::mCherryと表記する) を作成した。これを線虫に遺伝子導入することで、HAF-9::mCherryを発現するトランスジェニック線虫を得て、HAF-4::GFPを発現するトランスジェニック線虫と掛け合わせることにより、HAF-4::GFPとHAF-9::mCherryの両者を発現する線虫を作成し、その観察をおこなった。

線虫における各タンパクの発現は、蛍光タンパクに対する抗体や、既に作製していた

HAF-4 もしくは HAF-9 への抗体による Western blot 法により解析した。その際は、線虫の可溶性画分と不溶性画分を常法の線虫実験プロトコールに従い分離して行った。

(2) 線虫 ABC 輸送体 HAF-4、HAF-9 のリソソーム様オルガネラ形成における役割

haf-4 欠損変異体、*haf-9* 欠損変異体をはじめとする本実験で用いた変異体のほとんどは、米国線虫ゲノムセンター (CGC) より供与いただいた。

腸内顆粒の回復実験では、HAF-4::GFP を発現するトランスジェニック体と *haf-4* 欠損変異体との遺伝学的掛合せの手法を用いた。

基質輸送活性と顆粒の形成に関する実験では、まず線虫 *haf-4* の ABC 領域内の WalkerA 配列にあるアミノ酸残基をリジンからメチオニンに変異させることで輸送活性能を消失した HAF-4 (K539M)::GFP の線虫発現ベクターを作成した。これを HAF-4::GFP と同様に用いて、トランスジェニック体の作製や回復実験を行った。

(3) HAF-4/HAF-9 の局在する腸内顆粒の解析

線虫の腸内顆粒の性状解析については、まずアクリジンオレンジなどのオルガネラ染色試薬で HAF-4::GFP トランスジェニック体や *haf-4* 欠損変異体などを染色して観察した。更に、ミトコンドリア、リソソーム、ゴルジ体など各種オルガネラマーカー遺伝子を蛍光蛋白と融合させたコンストラクトを用いて、これらのマーカーとの共発現を蛍光顕微鏡下で観察した。

電子顕微鏡に用いる線虫試料は、常法の線虫実験プロトコールを参考に、固定条件等を改変して作製した。実際の電子顕微鏡の切片作製とデータ取得は岩手医科大学バイオイメージングセンターの電子顕微鏡部門の協力により行われた。

腸内顆粒の精製は、線虫ペルオキシゾームの精製を取り扱った文献を参考に行った。その他の一般的な線虫の飼育や取り扱い、線虫データベースの WormBase や線虫プロトコールの常法に従った。

4. 研究成果

(1) 線虫 ABC 輸送体 HAF-4、HAF-9 の腸細胞における細胞内局在解析

① HAF-4 及び HAF-9 の発現部位

まず、HAF-4::GFP を発現するトランスジェニック線虫を作成し、HAF-4 の腸細胞内局在を解析した。その結果、HAF-4::GFP のシグナルは、自家蛍光顆粒とは異なる一部の腸内顆粒の膜上に局在していた。また、GFP 抗体並びに HAF-4 に対する抗体を用いた解

析から、HAF-4::GFP は予想通り膜画分に回収され、HAF-4 は膜輸送体としてある種の腸内顆粒で発現し機能することが示唆された。

HAF-9 についても同様の実験を行った。HAF-9::mCherry 及び HAF-9::GFP を発現するトランスジェニック線虫を作成し、HAF-9 の局在を解析した。その結果、いずれのトランスジェニック線虫においても HAF-4 の場合と同様に、シグナルは自家蛍光顆粒とは異なる一部の顆粒膜上に局在していた。

② HAF-4 と HAF-9 の共局在

HAF-4::GFP 発現線虫と HAF-9::mCherry 発現線虫との掛け合わせ実験を行った。その結果、両者は同じ顆粒に共局在することが示された。線虫 ABC 輸送体 *haf-4* と *haf-9* のそれぞれの欠損変異体は、腸内顆粒の消失をはじめ、複数の共通する表現型を有していたが、同じ腸内顆粒に共局在することからも、2つの輸送体蛋白は相互作用、もしくは協調して機能する可能性が考えられた。

(2) 線虫 ABC 輸送体 HAF-4、HAF-9 のリソソーム様オルガネラ形成における役割

① *haf-4*、*haf-9* 欠損変異体にみられる腸内顆粒の消失

haf-4 欠損変異体、並びに *haf-9* 欠損変異体において、高倍率顕微鏡下で形態等の変化があるかどうかについて観察した。その結果、野生型 N2 株線虫と比較して、幼虫期から若い成虫期に関して、著しい腸内顆粒の減少が見いだされた。しかし、自家蛍光顆粒の減少は見られず、消失した腸内顆粒は、HAF-4、HAF-9 が発現している顆粒である可能性が考えられた。また、この表現型はホモの欠損変異体で観察され、ヘテロの欠損変異体では見られず、劣性の遺伝形質と考えられた。

② 変異体の回復実験

そこで、*haf-4* 欠損変異体において見出した腸内顆粒の消失は、HAF-4::GFP の過剰発現により回復するかどうかを調べた。実際には、*haf-4* 欠損変異体と HAF-4::GFP を過剰発現するトランスジェニック線虫とを掛け合わせてその表現型を解析した。その結果、HAF-4::GFP を過剰発現した *haf-4* 欠損変異体では、自家蛍光のない腸内顆粒の数が増大し、野生型のように回復した。また、線虫を蛍光顕微鏡下で観察するとその顆粒には HAF-4::GFP の局在が認められた。以上の結果から、自身の局在する腸内顆粒の形成に必要なことがわかった。

③ 線虫 HAF-4 局在顆粒の形成における輸送活性の必要性の検討

次に、*haf-4* 欠損変異体への HAF-4::GFP

の過剰発現による、腸内顆粒の回復には、この線虫ABC輸送体の基質輸送活性が必要であるか否かについて調べた。HAF-4のWalkerA配列内のアミノ酸残基を変異させ輸送活性を消失したHAF-4(K539M)::GFPの線虫発現ベクターを作成し、変異体へ導入した場合の腸内顆粒の状態を観察した。その結果、HAF-4(K539M)::GFPを過剰発現する*haf-4*欠損変異体では、HAF-4::GFPの場合と異なり、腸内顆粒の数の増大は見られなかった。また、HAF-4(K539M)::GFPの局在も顆粒以外に所々に点在していた。以上の結果から、着目する腸内顆粒の形成にはHAF-4の基質輸送活性が必要であることが明らかとなった。

なお詳細は割愛するが、これらのHAF-4に関する解析と同様の結果が、HAF-9を同じく用いた解析でも得られたこれらの結果は、膜輸送体の基質輸送能の異常が輸送基質の局在のみならず、自身の存在するオルガネラの形成にも影響する点で、興味深い新しい知見である。

(3) HAF-4/HAF-9の局在する腸内顆粒の解析

① オルガネラ染色試薬やオルガネラマーカー等を用いた腸内顆粒の解析

解析されていない線虫の腸内顆粒の分類を行った。HAF-4::GFPの局在する腸内顆粒と、各種蛍光蛋白融合型オルガネラマーカー蛋白との共局在、もしくはオルガネラ染色色素との局在の比較を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、HAF-4の局在する腸内顆粒は、線虫のLAMPホモログLMP-1と共局在するが、酸性オルガネラを染色するアクリジンオレンジでは染色されない、非酸性顆粒であることが明らかとなった。

② 電子顕微鏡による腸内顆粒の観察

*haf-4*欠損変異体の腸細胞内オルガネラについて、腸内顆粒の異常に至るまでにどのような細胞内の変化が生じているのかを詳細に検討するため、透過型電子顕微鏡による細胞内微細構造の観察を行った。その結果、何種類かの区別できる腸内顆粒に関して、野生型にはあるが、*haf-4*欠損変異体にはほとんど見られない顆粒が同定できた。また、高倍率顕微鏡レベルの観察では顆粒が消失するという同じ表現型を示すと思われた他の既知の変異体(*Imp-1*、*tat-1*)とも透過型電子顕微鏡資料を作成して比べた結果、明らかに異なる腸内顆粒の形態異常を示すことが示された。

③ 栄養状態の変化に伴う腸内顆粒の変動

HAF-4::GFP発現線虫において、栄養状態の変化(幼虫における飢餓刺激と、飢餓状態からの回復)に伴う、腸内顆粒の変動を調べた。

トランスジェニック体におけるHAF-4::GFP陽性顆粒を顕微鏡観察した結果、飢餓刺激で顆粒は消失したが、餌再投与でHAF-4::GFP陽性顆粒が再形成されることが観察され、栄養状態によりHAF-4::GFPの発現する腸内顆粒は変動することが明らかになった。

④ HAF-4/HAF-9局在顆粒の精製法の確立

HAF-4::GFP陽性腸内顆粒の分離・精製に関して、条件検討を進めた。線虫の生殖腺の発達する前に個体を破砕し、脱核して分画することで腸内顆粒の精製自体は行うことができた。しかしながら、量的問題(純度を高めると極端に少量の顆粒しか精製できない点)を解決できなかったため、今後続く顆粒の性状解析に関しては、研究戦略を変更して、個体(野生型と変異体の幼虫腸全体)を用いたプロテオーム解析を進めることとした。

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6件)

- ① Maeda M., Ohashi-Kobayashi A. ABC transporter TAP-like and TAP family. *Seikagaku* 査読有 79. 2007. 588-596.
- ② Ohara T., Ohashi-Kobayashi A., Maeda M. Biochemical characterization of transporter associated with antigen processing (TAP)-like (ABCB9) expressed in insect cells. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有 31. 2008. 1-5.
- ③ Tsuge T., Uetani K., Sato R., Ohashi-Kobayashi A., Maeda M. Cyclic AMP-dependent proteolysis of GATA-6 expressed on the intracellular membrane. *Cell Biol. Int.* 査読有 32. 2008. 298-303.
- ④ Kamakura A., Fujimoto Y., Motohashi Y., Ohashi K., Ohashi-Kobayashi A., Maeda M. Functional dissection of transmembrane domains of human TAP-like (ABCB9). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 377. 2008 847-851.
- ⑤ Tanji T., Shiraishi H., Natori S., Ohashi-Kobayashi A. Differential activation of the lectin and antimicrobial peptide genes in *Sarcophaga peregrina* (the flesh fly). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 査読有 69. 2008 189-198.
- ⑥ Kawai H., Tanji T., Shiraishi H., Yamada M., Iijima R., Inoue T., Kezuka Y., Ohashi K., Yoshida Y., Tohyama K., Gengyo-Ando K., Mitani S., Arai H., Ohashi-Kobayashi A., Maeda M. Normal

formation of a subset of intestinal granules in *Caenorhabditis elegans* requires ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9, which are highly homologous to human lysosomal peptide transporter TAP-like. Mol. Biol. Cell 20. 2009 2979-2990.

[学会発表] (計 10 件)

- ①白石博久、丹治貴博、吉田康夫、遠山稿二郎、山田光男、前田正知、大橋綾子 線虫におけるリソソーム関連ABCトランスポーターの役割 (トランスポーター研究会第 1 回東北部会、仙台、平成 19 年 11 月 25 日)
- ②脇本菜有、大橋-小林綾子、安藤恵子、三谷昌平、前田正知 線虫 *C. elegans* の ABC 輸送体 haf-2 の発現解析 (BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会 合同年会、横浜、平成 19 年 12 月 11-15 日)
- ③Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Yasuo Yoshida, Koujiro Tohyama, Mitsuo Yamada, Masatomo Maeda, Ayako Ohashi-Kobayashi. Role of the *Caenorhabditis elegans* ABC transporter genes in the biogenesis of intestinal lysosome-related organelle (2008 East Asia *C. elegans* Meeting、上海、平成 20 年 4 月 18-21 日)
- ④白石博久、吉田康夫、丹治貴博、遠山稿二郎、大橋綾子 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、矢巾、平成 20 年 10 月 26 日)
- ⑤白石博久、丹治貴博、吉田康夫、遠山稿二郎、前田正知、大橋綾子 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)、神戸、平成 20 年 12 月 9 日)
- ⑥丹治貴博、白石博久、大橋綾子 線虫の補体系因子 C3 様蛋白 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)、神戸、平成 20 年 12 月 9 日)
- ⑦Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Yasuo Yoshida, Koujiro Tohyama, Keiko Gengyo-Ando, Shohei Mitani, Masatomo Maeda, Ayako Ohashi-Kobayashi 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、ロサンゼルス、平成 21 年 6 月 24 日-27 日)

- ⑧Hirohisa Shiraishi, Takahiro Tanji, Kenji Nishikori, Ayako Ohashi-Kobayashi Physiological roles of putative intracellular peptide ABC transporters in *C. elegans* intestine (3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium、西帰浦、平成 21 年 11 月)
- ⑨白石博久、丹治貴博、脇本菜有、安藤恵子、三谷昌平、前田正知、大橋綾子 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、横浜、平成 21 年 12 月 9 日-12 日)
- ⑩Takahiro Tanji, Hirohisa Shiraishi, Kenji Nishikori, Ayako Ohashi-Kobayashi Functional analysis of lysosomal peptide transporters in *C. elegans* (BIT Life Sciences' 3rd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2010)、北京、平成 22 年 3 月 21 日-23 日) (招待講演)

[その他]

線虫データベース WormBase に文献登録
<http://www.wormbase.org/db/misc/biblio?name=WBGene00001814;class=Gene>
<http://www.wormbase.org/db/misc/biblio?name=WBGene00001819;class=Gene>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋綾子 (OHASHI AYAKO)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：90272484

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

白石博久 (SHIRAISHI HIROHISA)
岩手医科大学・薬学部・講師
研究者番号：80393156

丹治貴博 (TANJI TAKAHIRO)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：60453320

錦織健児 (NISHIKORI KENJI)
岩手医科大学・薬学部・助手
研究者番号：20563844