

平成21年 5月 8日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791268
 研究課題名 (和文) 網膜色素上皮細胞における amphiphysin I バリエーションの役割
 研究課題名 (英文) Studies on the function of amphiphysin I in retinal pigment epithelium.
 研究代表者
 細谷 修 (HOSOYA OSAMU)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：90304310

研究成果の概要： Amphiphysin I (amph I) は網膜に特有なエンドサイトーシス関連タンパク質である。このタンパク質は、感覚神経性網膜のリボンシナプス部と網膜色素上皮層に強く発現する。本研究ではヒト網膜色素上皮培養細胞株 (ARPE-19) を実験モデルに用い、ヒト網膜色素上皮層に発現する amph I の果たす役割を調べた。その結果、色素上皮細胞のトランスフェリン受容体介在型エンドサイトーシス経路の細胞内輸送過程に amph I が関与することが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼生化学・分子生物学、眼細胞生物学、網膜、網膜色素上皮細胞、
 エンドサイトーシス、生体膜、エンドソーム、膜輸送と輸送タンパク質

1. 研究開始当初の背景

Amphiphysin I (amph I) は網膜特異的に発現するエンドサイトーシス関連タンパク質で、神経終末においてシナプス小胞膜の回収に関与するとされる amphiphysin I の新規オルタナティブスプライスバリエーションとして、当研究室でヒトおよびラット網膜 cDNA ライブラリーを用いてクローニングしたものである (Terada et al., FEBS Lett., 519, 185-190, 2002)。ラット網膜を用いた免疫組織化学と生化学的解析から、amph I が感覚

神経性網膜に存在する特殊なシナプスであるリボンシナプス特異的に発現し、そこで営まれるシナプス小胞膜の回収にクラスリン依存性エンドサイトーシス機構を介して関与する可能性を報告した (Hosoya et al., Eur. J. Neurosci., 19, 2179-2187, 2004)。

網膜を構成する組織には、感覚神経性網膜の他に網膜色素上皮層がある。最近、ヒト眼球の網膜色素上皮層での amph I の発現の有無を確認する機会を得て、Western blot によりタンパク質の検出を行なった。その結果、

ヒト眼球の網膜色素上皮層にも amph Ir が発現することが新たに分かった。

網膜色素上皮細胞は視細胞外節の貪食作用による更新や、血液循環系と感覚神経性網膜間の能動的な物質交換を担い、そのため発達した細胞内小胞輸送システムとこれに関係する多様なエンドサイトーシス経路をもつと想定されている。このことから、網膜特異的に発現するエンドサイトーシス関連タンパク質である amph Ir の機能を調べることは、不明な点が多いヒト網膜における視覚情報伝達のみならず、色素上皮が営む視細胞の健全性維持のための分子メカニズムの理解にとっても重要な研究課題であると考えられた。

2. 研究の目的

Amph Ir の機能を解明することは不明な点が多い網膜視機能の発現・維持の基盤をなす分子機構の理解に必要なだけでなく、網膜疾患の原因の追究や治療法の開発など、臨床・基礎医学分野の進展にも貢献する情報をもたらす可能性がある。

感覚神経性網膜を対象とした機能分子の解析の為に、これまでに様々な方法論が開発されている。遺伝子改変動物を用いた解析が最も有力な手段と思われるが、動物の作製に時間・費用を要し、特殊な手技の修得や実験施設を必要とする。また、簡便で再現性の高い、細胞や組織の初代培養法が十分に確立されていない点や、amph Ir の解析に適切と思われる視細胞や双極細胞由来の培養細胞株が利用できないなどの理由から、感覚神経性網膜を対象とした amph Ir の機能解析の進展には難しい面があった。そこで、当研究室ではヒト網膜色素上皮層に amph Ir が発現するという結果を受けて、ヒトの同組織由来の培養細胞株 (ARPE-19) での amph Ir の発現の有無を Western blot で調べた。その結果、amph Ir は ARPE-19 でも発現することを確認した。ARPE-19 は培養下において、生体組織下にみられる色素上皮細胞の種々の特徴を良く発現・維持することが知られることから、ヒト眼球網膜色素上皮層における amph Ir の生理機能を理解する上で良い実験モデルになると考えた。

本研究では ARPE-19 を用いて amph Ir がヒト網膜色素上皮のエンドサイトーシスやそれに関係する細胞内小胞輸送システムへ関与する可能性を調べた。

3. 研究の方法

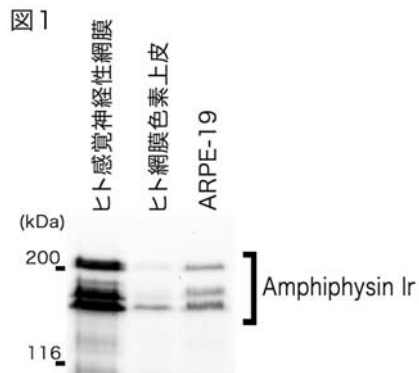
- (1) ヒト眼球の網膜色素上皮層および ARPE-19 における amph Ir の発現の確認と細胞内分布様式の解析. Amph Ir を特異的に認識するポリクローナル抗体を用いた Western blot および免疫細胞化学を施行した。細胞内分布様式の解析では、何らかの細胞内小器官との結合や他のタンパク質との複合体形成の可能性を考慮し、各種オルガネラやタンパク質に対する標識試薬や抗体を併用した二重蛍光標識も行った。
- (2) クラスリン依存型エンドサイトーシス経路の可視化とその経路での amph Ir 局在解析. クラスリン依存型エンドサイトーシスの代表例の 1 つにトランスフェリン受容体の取り込みがある。そこで蛍光標識トランスフェリンを追跡子として ARPE-19 に取り込ませ、Pulse-Chase 法でトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスの各過程をラベルし、被覆陥凹構造、輸送小胞やエンドソームでの amph Ir の局在の有無を免疫細胞化学で調べた。
- (3) RNAi による amph Ir 特異的な遺伝子発現抑制の誘導. クローニングにより得た塩基配列情報をもとに、ヒトの amph Ir 特異的に遺伝子発現抑制効果を誘起する small interfering RNA (siRNA) を合成し、ARPE-19 への高効率で細胞毒性の低い siRNA 導入法を検討した。
- (4) Amph Ir ノックダウンのクラスリン依存型エンドサイトーシスに与える影響. siRNA 導入により amph Ir タンパク質の発現量を抑制した ARPE-19 に対し、トランスフェリンを用いた Pulse-Chase アッセイを行ない、細胞表面での取り込みや、それに引き続く細胞内輸送過程をモニターした。
- (5) 新規の amph Ir 相互作用タンパク質の検索. これまでに網膜リボンシナプスでの相互作用タンパク質として複数のエンドサイトーシス関連タンパク質が同定された。ARPE-19 においても同様のタンパク質が相

相互作用の相手として同定されるのか、それとも新規の結合パートナーが存在するのかを調べた。ARPE-19細胞溶解液から免疫沈降法で amph Ir と共沈降する複合体を調製し、これを質量分析法で解析した。有力な結合タンパク質候補に対しては、Western blot での確認や二重蛍光染色による amph Ir との細胞内分布の比較を行なった。

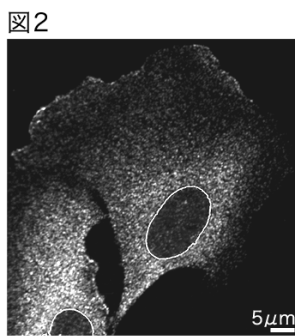
4. 研究成果

(1) Western blot 解析から、amph Ir はヒト感覚神経性網膜の他に、ヒト網膜色素上皮層、ARPE-19 にも発現することが分かった(図 1)。

[図 1. 説明] Western blot 解析結果。各サンプルのトータルタンパク質(等量)を SDS-PAGE 電気泳動で分離し、PVDF 膜にブロット後、抗 amph Ir 抗体で検出した。



(2) 免疫細胞化学により、ARPE-19 では amph Ir の大部分が細胞質に瀰漫性に、一部が細胞内小器官(クラスリン陽性微小構造、初期エンドソーム等)に局在することが分かった(図 2)。また、一部の細胞でミトコンドリアへの局在が観察された。ヒト眼球網膜色素上皮層での分布解析を試みたが、組織に含まれるリポフスチンに起因する自家蛍光により解析が進んでいない。



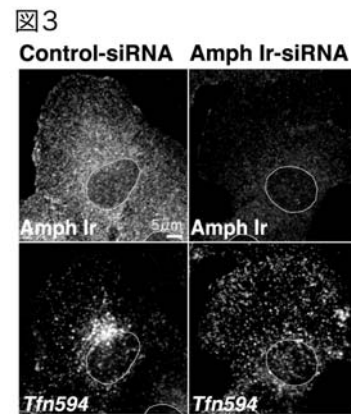
含まれるリポフスチンに起因する自家蛍光により解析が進んでいない。

[図 2. 説明] ARPE-19 を 4% パラフォルムアルデヒドで固定、一次抗体と二次抗体にそれぞれ抗 amph Ir 抗体と蛍光標識ヤギ抗ウ

サギ IgG 抗体を反応させた。

(3) ARPE-19 で、amph Ir タンパク質の発現量を特異的にかつ効率よく抑制する siRNA の合成と導入法の確立ができた。Amph Ir タンパク質の発現量抑制は、細胞の成長、生存率、形態(外観)には影響を与えなかった。また、細胞内オルガネラについても形態学的な解析を行なったが、明らかな表現型変化はみられなかった。

(4) Amph Ir 発現量抑制細胞に対し、標識トランスフェリンを用いてクラスリン依存性エンドサイトーシス経路を追跡したところ、初期エンドソームから細胞核近傍に位置する endosomal recycling component (ERC) へのトランスフェリン-受容体の細胞内輸送過程が障害されることが分かった(図 3)。



[図 3. 説明] Amph Ir を発現する細胞(左パネル上)では取り込んだ蛍光標識トランスフェリンが細胞核(白線囲み)近傍の ERC に集積した(左パネル下)。一方、amph Ir 発現抑制細胞(右パネル上)では、取り込んだトランスフェリンは細胞質に広く分布する初期エンドソームに含まれた(右パネル下)。

(5) 免疫沈降法により得た amph Ir 共沈降複合体を LS/MS および Western blot で解析したところ、amph Ir の新たな相互作用分子の候補としてミオシン IIA (非筋タイプ)を見出した。今後の課題として、amph Ir との細胞内分布パターンの比較や、両者が結合する際に必要なドメイン・領域の同定、結合様式等を調べる必要がある。

ARPE-19 を用いた今回の研究から、amph Ir はヒト網膜色素上皮細胞におけるクラスリ

ン(トランスフェリン受容体)依存性エンドサイトーシス経路のうち、初期エンドソームでの細胞内輸送機構に関与する可能性が示された。ヒト眼球網膜色素上皮層では amph Ir がドミナントに発現することから、同組織の細胞膜でのクラスリン被覆ピット・被覆小胞の形成過程にも amph Ir が働く可能性があるが、この可能性を示唆する結果はまだ得られていない。この理由は不明だが、ARPE-19 では amph Ir の他にもう一種類 amphiphysin I バリエントを発現しており、amph Ir の発現を抑制した場合に、もう一種類のバリエントが amph Ir の担っていた役割を(部分的に)補完する可能性がある。今後、amph Ir に加え、もう一種類の amphiphysin I バリエントに対する機能阻害解析を ARPE-19 で行ない、amph Ir がヒト網膜色素上皮における受容体依存性エンドサイトーシス経路の細胞内輸送にのみ関与するのか、それとも細胞膜での物質取り込みと細胞内輸送の両過程に関与するのかを明確にしたい。

今回、amph Ir がトランスフェリン受容体の細胞内輸送過程に関与することが分かった。トランスフェリンは正常な生物活動の維持・発現に必須の元素である鉄イオンと結合し、その運搬を担う分子である。また、細胞内輸送の異常に関わる疾患が存在することを鑑みると、網膜疾患発症の要因となる網膜色素上皮の機能不全の原因を探る上でも amph Ir の担う役割の解明が重要であることが示めされた。近年、細胞内輸送過程に多様なモータータンパク質が必要であることが明らかにされつつあることから、今後ミオシン IIA との相互作用の解明を中心に、初期エンドソームでの物質輸送における amph Ir の役割を追究する必要がある。

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4件)

- ① 筒井 公子、細谷 修、網膜リボンシナプスの情報伝達と網膜特異的 Amphiphysin Irの機能、Acta Anatomic Nipponica, 84 Supplement, 86, 2009, 査読無し
- ② 松尾 俊彦、内田 哲也、財部 健一、細谷

修、筒井 公子、人工網膜からみた網膜神経細胞の機能、Acta Anatomic Nipponica, 84 Supplement, 87, 2009, 査読無し

- ③ Takayuki Tamaki, Toshihiko Matsuo, Osamu Hososya, Kimiko M Tsutsui, Tetsuya Uchida, Kazuo Okamoto, Akihiko Uji, Hiroshi Ohtsuki, Glial reaction to photoelectric dye-based retinal prostheses implanted in subretinal space of rats, Journal of Artificial Organs, 11, 38-44, 2008, 査読有り
- ④ Osamu Hosoya, Kimiko M Tsutsui, Ken Tsutsui, Amphiphysin Ir participates in receptor-mediated endocytosis in ARPE-19, Neuroscience Research, 58/S1, S95, 2007, 査読無し

[学会発表] (計3件)

- ① 筒井 公子 他、網膜リボンシナプスの情報伝達と網膜特異的 Amphiphysin Ir の機能、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009.3.29、岡山理科大学
- ② 松尾 俊彦 他、人工網膜からみた網膜神経細胞の機能、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009.3.29、岡山理科大学
- ③ Osamu Hosoya et al., Amphiphysin Ir participates in receptor-mediated endocytosis in ARPE-19, Neuro2007, 2007.9.10, パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

細谷 修 (HOSOYA OSAMU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90304310

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

筒井 公子 (TSUTSUI KIMIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70144748

筒井 研 (TSUTSUI KEN)

岡山大学・自然生命科学研究支援センター・教授

研究者番号：70108158