

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06663

研究課題名(和文) ショウジョウバエ視細胞における極性輸送のライブイメージングによる観察

研究課題名(英文) The mechanism of cargo transports in Drosophila photoreceptors

研究代表者

佐藤 明子 (Sato, Akiko)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・教授

研究者番号：30529037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な構造を持つショウジョウバエ視細胞が、その構造を形成・維持するために必要な機構、極性輸送に関わる因子を同定し解析を行った。具体的には、側底面への輸送に必要なCrag/Rab10/Ehbp1と光受容膜への輸送に必要なRab11を活性化するGEFであるPcsを同定し、その解析結果を報告した。また、光受容膜への極性輸送に必要なRab11がゴルジ体のトランス側に付着している意味について解析を行い、ゴルジ体とリサイクリングエンドソーム(RE)の密接な関係を見出した。このゴルジ体へ付着したREは一部の膜タンパク質を選別して取り込み、ゴルジから離れることで特定の細胞膜ドメインへ輸送していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複雑な構造を持つショウジョウバエ視細胞が、その構造を形成・維持するために必要な機構、極性輸送に関わる因子を同定し解析を行った。このような因子の欠損はしばしば網膜変性症を発症することから、人の疾患の原因解明や治療に重要な知見である。また、リサイクリングエンドソーム(RE)とゴルジ体の関係を解析した結果、REがこれまでトランスゴルジ網(TGN)と呼ばれてきた構造とほぼ同じ膜構造体ではないかと考えられた。これは、TGN、REの定義の再考を促す細胞生物学上の重要な発見である。

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; however, its mechanism is not well understood. 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, rhabdomere, stalk, and basolateral membrane. Here we found Crag/Rab10/Ehbp1 regulate the basolateral transport and Pcs activate Rab11 for the rhabdomere transport. We also analyzed the relationship between Golgi stacks and recycling endosomes, and found Golgi attached RE receives some kinds of cargos from Golgi and detach from Golgi for transport cargos to the plasma membrane.

研究分野：膜交通

キーワード：ゴルジ体 ショウジョウバエ 視細胞 網膜

## 1. 研究開始当初の背景

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。

## 2. 研究の目的

本研究は、ショウジョウバエ視細胞をモデルとして、光受容膜・ストーク膜・側底面膜の3つの異なる膜ドメインへの極性輸送の分子機構を明らかにすることを目的としている。また、光受容膜への極性輸送にはゴルジ体に付着したリサイクリングエンドソーム(RE)が関わることを見出したので、ゴルジ体とREの関係について、種を超えた解析を行い、REの役割を考察することも、もう1つの目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、ショウジョウバエ遺伝学・共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡を用いた組織観察イメージングを駆使することで、ショウジョウバエ視細胞における極性輸送に関わる因子の機能を詳細に観察する。また、培養細胞を用いてライブイメージングを行うことで、ゴルジ体とREの関係性、さらに積荷タンパク質の輸送過程を観察する。

## 4. 研究成果

ショウジョウバエ視細胞における極性輸送に関わる因子を同定し、その詳細な解析を行い、論文として報告した。以下に箇条書きで述べる。

- 1) Rab10とその活性化因子(GEF)であるCrag、さらにRab10エフェクター、Ehbp1が側底面への輸送に必要であることを見出した。電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による詳細な観察より、Crag/Rab10/Ehbp1はポストゴルジ小胞の形成に必要であると考えられた。これらの結果を1つの論文としてまとめ報告した (Nakamura et al., 2019)。
- 2) 我々のグループの過去の研究で、ショウジョウバエ視細胞においてRab11がロドプシンの光受容膜へのポストゴルジ輸送に必要であることを示していたが、Rab11を活性化するGEFは未同定であった。そこで本研究では、Rab11を活性化するGEFを探索した。その結果、Pcsが視細胞で機能する主なRab11GEFであることを突き止め報告した (Otsuka et al., 2019)。
- 3) 極性輸送の関わる因子について、RNAiを網膜でモザイク状に発現するツールを用いてスクリーニングを行った。その結果、Strat遺伝子欠損が、側底面と光受容膜の両方向のポストゴルジ輸送が欠損することを見出した。StratはRabタンパク質のGEFまたはシャペロンとして働くと報告されている。本研究では、Strat欠損により、Rab10とRab35のタンパク質量が著しく減少すること、一方、Rab11の量には影響を与えないことを見出した。さらに、Rab35欠損により光受容膜へのポストゴルジ輸送が阻害されることを見出し、StratがRab10、Rab35のシャペロンとして機能することで、側底面膜と光受容膜への輸送に必要であると考えられた。現在、この結果をまとめた論文を投稿している。
- 4) 極性輸送の関わる因子についてのRNAiスクリーニングでは、さらにSNAREタンパク質であるnSybが光受容膜へのポストゴルジ輸送に必要であることも見出した。さらにnSyb機能を詳細に解析する過程で、nSybが生合成されたロドプシンのみならず、光依存的にエンドサイトーシスされたロドプシンの光受容膜へのリサイクリング輸送にも必要であることを見出した。生合成

経路とリサイクリング経路は、ポストゴルジ輸送過程のどこかで合流し、ともに光受容膜へと輸送されると考えられた。現在、この結果をまとめた論文も投稿中である。

- 5) 極性輸送の関わる因子についての RNAi スクリーニングを引き続き行い、ショウジョウバエゲノムに存在する全 SNARE タンパク質について解析を行った。さらに、体細胞 CRISPR/Cas9 法によっても、多くの SNARE タンパク質について欠損クローンを網膜の一部に作成し解析を行った。これらの結果、新たに光受容膜と側底面膜への輸送に関わる SNARE を同定することに成功しており、現在、論文を準備している。また、小胞体とゴルジ体間の輸送に機能すると考えられている SNARE の欠損で興味深い表現型を見出したので、こちらについても論文を準備している。

- 6) 我々のグループの過去の研究において、新生ロドプシンがゴルジ体からリサイクリングエンドソーム(RE)を経由して細胞膜まで輸送されること、その過程が Rab11 に依存すること、ゴルジ体の構成単位であるゴルジ層板のトランス側に RE が付着していることを発見していた(Satoh et al., 2005 など)。本研究では、

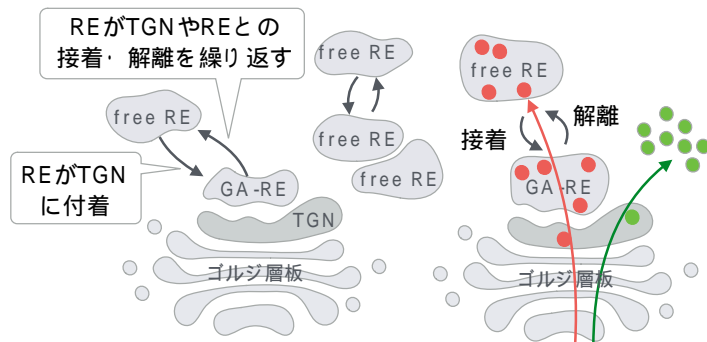


図1. TGNとREの接着と解離

この一般性を問うために、ゴルジ層板とREの関係を、ハエの様々な組織、微小管破壊によりゴルジ層板を散在させた哺乳類細胞、ウニ幼生において検討した。その結果、REはいずれの動物・組織においてもゴルジ層板付着型(Golgi attached-RE: GA-RE)と遊離型(free-RE)の2つの状態で存在することを見出した。さらに哺乳類やショウジョウバエ培養細胞をライブイメージングすると、この2つの状態はREのゴルジ層板に対する付着と遊離の繰り返しによって生じることがわかった。HeLa細胞を用いて積荷タンパク質輸送とGA-REの関係を検討した結果、限られた種類の積荷のみがゴルジ層板からゴルジ層板付着型RE(GA-RE)を経由したのち、free-REによって細胞膜へと輸送されることを見出した(図1)。これらの結果を、2本の論文として報告した(Fujii et al., 2020a,b)。

- 7) ゴルジ層板の細胞内での分布は種によって異なっており、ショウジョウバエ・線虫・植物などでは、細胞質中に散在しているのに対して、哺乳類細胞では、核周辺部に集合している。私達は、ライブイメージング観察により、ハエの分散型ゴルジ層板が細胞内を活発に移動し、トランス側で接着と解離を繰り返していること、ハエにおけるゴルジ体の分離には Sec71 が必要であり、Sec71 欠損によりゴルジ層板は哺乳類のように集合型を示すことを見出した。私達の発見は、動植物種で行っているゴルジ層板の散在型・集合型という2つの状態が、ゴルジ層板の接着と解離の活性のバランスによって決まっていることを示唆している (Fujii et al., 2020c)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura Yuri, Ochi Yuka, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.	4. 巻 133
2. 論文標題 Rab10, Crag and Ehbp1 regulate the basolateral transport of Na+K+ATPase in Drosophila photoreceptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.238790	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Syara, Tago Tatsuya, Sakamoto Naoaki, Yamamoto Takashi, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Recycling endosomes associate with Golgi stacks in sea urchin embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19420889.2020.1761069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Syara, Kurokawa Kazuo, Tago Tatsuya, Inaba Ryota, Takiguchi Arata, Nakano Akihiko, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.	4. 巻 133
2. 論文標題 Sec71 separates Golgi stacks in Drosophila S2 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.245571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Syara, Kurokawa Kazuo, Inaba Ryota, Hiramatsu Naoki, Tago Tatsuya, Nakamura Yuri, Nakano Akihiko, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.	4. 巻 133
2. 論文標題 Recycling endosomes attach to the trans-side of Golgi stacks in Drosophila and mammalian cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.236935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiramatsu Naoki, Tago Tatsuya, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.	4. 巻 30
2. 論文標題 ER membrane protein complex is required for the insertions of late-synthesized transmembrane helices of Rh1 in <i>Drosophila</i> photoreceptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2890 ~ 2900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E19-08-0434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogi Sakiko, Matsuda Atsushi, Otsuka Yuna, Liu Ziguang, Satoh Takunori, Satoh Akiko K.	4. 巻 146
2. 論文標題 Syndapin constricts microvillar necks to form a united rhabdomere in <i>Drosophila</i> photoreceptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.169292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Otsuka Yuna, Satoh Takunori, Nakayama Nozomi, Inaba Ryota, Yamashita Hitomi, Satoh Akiko K.	4. 巻 132
2. 論文標題 Parcas is the predominant Rab11-GEF for rhodopsin transport in <i>Drosophila</i> photoreceptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.231431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山下愛美、佐藤卓至、佐藤明子
2. 発表標題 ショウジョウバエ視細胞を用いた極性輸送におけるARFRP1の機能解析
3. 学会等名 日本生化学会 中四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 多胡辰哉、小川巧、佐藤卓至、佐藤 明子
2. 発表標題 ショウジョウバエ視細胞における光制御による同調的輸送開始法の開発
3. 学会等名 日本生化学会 中四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井しゅら・佐藤卓至・黒川量雄・稲葉諒多・佐藤明子
2. 発表標題 リサイクリングエンドソームの一部がゴルジ体のトランス面に付着している
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井しゅら・佐藤卓至・黒川量雄・白江麻貴・植木龍也・トリ-クストノ-アジ・稲葉諒多、佐藤明子
2. 発表標題 多様な生物種におけるゴルジ体とREの関係性
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越智優果・中村祐里・佐藤卓至・佐藤明子
2. 発表標題 ショウジョウバエ視細胞において Crag/Rab10/Ehbp1は 側底面膜方向への極性輸送を制御する
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井しゃら・黒川量雄・佐藤卓至・稲葉諒多・佐藤明子
2. 発表標題 ゴルジ層板の分散と凝集のメカニズムの解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井しゃら・佐藤卓至・黒川量雄・中野明彦・佐藤明子
2. 発表標題 リサイクリングエンドソームはゴルジ層板のトランス側に付着し、生合成された膜タンパク質の選別に関わっている
3. 学会等名 <異分野融合による次世代光生物学>研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤明子
2. 発表標題 リサイクリングエンドソームはゴルジ層板のトランス側に付着している
3. 学会等名 第3回 オルガネラ・ゾーン 研究
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下愛美・中山望美・佐藤卓至・佐藤明子
2. 発表標題 APEX2を用いた電子顕微鏡レベルでの局在解析法のショウジョウバエ視細胞研究への 導入
3. 学会等名 2019年度 中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井しゃら・佐藤卓至・佐藤明子2
2. 発表標題 ゴルジ体とリサイクリングエンドソームの相互作用による極性輸送
3. 学会等名 2019年度 中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧口新・藤井しゃら・佐藤卓至・佐藤明子
2. 発表標題 SBF-SEM を用いたゴルジ体の集合性の解析
3. 学会等名 2019年度 中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越智優果・佐藤卓至・佐藤明子
2. 発表標題 シヨウジョウバエ視細胞におけるRNAiスクリーニングによる極性輸送に関する因子の探索
3. 学会等名 2019年度 中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多胡辰哉・小川巧・佐藤卓至・佐藤明子
2. 発表標題 光制御による同調的な輸送開始法の開発
3. 学会等名 2019年度 中国四国動物生理シンポジウム
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 瀧口新、佐藤卓至、佐藤明子
2. 発表標題 GARP欠損による順行性輸送の分子機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下愛美・佐藤卓至・佐藤明子
2. 発表標題 シヨウジョウバエ視細胞を用いた極性輸送におけるARFRP1の機能解析
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多胡辰哉、小川巧、佐藤卓至、佐藤明子
2. 発表標題 シヨウジョウバエ視細胞における光制御による同調輸送開始法の開発
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤明子
2. 発表標題 光による同調的輸送開始法の開発
3. 学会等名 日本動物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤明子
2. 発表標題 ゴルジ/リサイクリングエンドソーム境界面のダイナミクスと選別輸送
3. 学会等名 新学術領域オルガネラゾーン セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------