

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21687005

 研究課題名（和文） ショウジョウバエ視細胞の形態形成と維持に関与する  
遺伝子の同定と機能解析

 研究課題名（英文） Identification and the analysis of the genes involved in  
photoreceptor morphogenesis and maintenance in *Drosophila*

研究代表者

佐藤 明子 (Satoh Akiko)

広島大学・大学院総合科学研究科・准教授

研究者番号：30529037

研究成果の概要（和文）： ショウジョウバエ網膜を用いた研究により、PIG 遺伝子群がロドプシンのトランスゴルジネットワークにおける選別過程に関与していることを示した（Development 誌に発表）。また、光感度調節機構としてのアレスチン移行の分子機構の詳細を明らかにし、Neuron、J. Neuroscience 誌に発表した。これらの分子機構は人でも共通している可能性があり、この成果が人の視覚機能の形成・維持に貢献できると考えている。

研究成果の概要（英文）： We screened to identify new genes involved in Rhodopsin transport and found two that the deficiency of glycosylphosphatidylinositol (GPI) synthesis/attachment processes causes the loss of the apical transport of Rhodopsin from the TGN (Development, 2013). In the process of studying Arrstin mediated signaling, we found that Arr2 translocation in *Drosophila* photoreceptors is driven by diffusion, but profoundly accelerated by phototransduction and Ca<sup>2+</sup> influx (Neuron 2010, J. Neursci. 2012)

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2010 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	18,300,000	5,490,000	23,790,000

研究分野：細胞生物学・視覚・神経科学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード： ショウジョウバエ・視細胞・ロドプシン・アレスチン・GPI 結合タンパク質・トランスゴルジネットワーク

## 1. 研究開始当初の背景

この研究の狙いは、人の視覚機能の維持に貢献することにある。材料として使用するショウジョウバエは先駆的な遺伝学・分子生物学的な手法を駆使できるすぐれた実験動物である。人とハエの目の構造は一見全く異なっているが、網膜発生、または、視細胞機能の多くに共通性がみられることが報告され、実際、ショウジョウバエは、網膜発生・網膜疾患の研究において強力なシステムとして認識されている。特に、ロドプシンの輸送の欠損や、光シグナル伝達の終了の欠損が、ハエと人の両方で、網膜変性症の原因であることが分かっている。

私はこれまで、お互いに関係のある3つの研究：1) ロドプシンの輸送機構、2) 視細胞の生と死へのアレクチンの機能、3) 光感度調節機構としてのタンパク質・細胞内小器官の光依存的分布変化、を推進してきた。

## 2. 研究の目的

上記3つの現象に関して、その分子機構を調べるために、RNAi、或いは致死性変異のモザイク網膜を用いたスクリーニングを行って、それらの過程に関わる分子を多数同定し、そのうちの数遺伝子に関して詳細な機能解析を行い、その分子機構について明らかにする。

## 3. 研究の方法

お互いに関係の深い3つの研究課題：1) ロドプシンの輸送機構、2) 視細胞の生と死へのアレクチンの機能、3) 光感度調節機構としてのタンパク質・細胞内小器官の光依存的分布変化、の各々に関して、その分子機構を調べるために、これらの過程に欠損のある変異体のスクリーニングを行う。これらの過程に関わる分子は、他の様々な細胞内の重要な過程にも関与すると考えられ、従って、そのような分子の変異体は致死性だと期待される。そこで、網膜特異的な遺伝子ノックダウンを行い、細胞内分子・小器官の可視化によって、迅速に多数の系統を生体スクリーニングする。遺伝子を同定したら、多様な技術を用いてその詳細な機能を解析する。

### 網膜特異的な遺伝子ノックダウン

スクリーニングには、特定の遺伝子を標的とする RNAi 系統、および遺伝子が特定されている挿入変異体を用いることで、変異遺伝子

の同定にかかる膨大な労力を省く。

タンパク質の細胞内輸送や、細胞死に関わる分子の変異体は致死性である可能性が高く、通常の方法で変異体を作成した場合、視細胞の形態形成や網膜変性を観察することが不可能である可能性が高い。この問題を回避するために、誘導 RNAi 法およびモザイク網膜を用いて、スクリーニングを行う

### 細胞内分子・小器官の可視化による生体スクリーニング

多数の系統を迅速にスクリーニングするため、生体視細胞の細胞内分子・小器官を水浸法・DPP 法で直接観察する。色素顆粒の位置は、色素顆粒自身による反射によって観察できる。その他の分子や小器官については、GFP・RFP 融合タンパク質 (Arr2-GFP と RFP-Ltd) を用いる。

## 4. 研究成果

課題 1) ロドプシンの輸送機構に関して、その分子機構を調べるために、これらの過程に欠損のある変異体のスクリーニングを行った。これらの過程に関わる分子は、他の様々な細胞内の重要な過程にも関与すると考えられ、従って、そのような分子の変異体は致死性だと期待された。そこで、FLP/FRT の方法を用い、変異細胞をもつモザイク網膜を作成した。また、遺伝子が特定されている挿入変異体を用い、変異遺伝子の同定にかかる膨大な労力を省いた。ストックセンターより取り寄せ可能な系統のうち、転写因子やミトコンドリアタンパク質に変異を持つものを除いた約 1000 系統ほどの FRT を持つ挿入変異体をスクリーニングし、6 つのロドプシン輸送に特異的 (NaK-ATPase 輸送は正常) に関与すると考えられるの変異を同定することに成功した。このうちの1つ、PIG 遺伝子については、詳細な解析からロドプシンのトランスゴルジネットワークにおける選別過程が欠損していると考えられ、これらの結果をまとめて論文発表を行なった。また、もう1つの遺伝子 dPob 変異体についても詳細な解析を行い、dPob がロドプシンを含む複数膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質のシャペロンとして機能することを明らかにした。こちらの結果は、現在論文を準備している。

課題 2) アレスチンは、G 蛋白質結合型受容体に結合し、そのシグナルを押さえる蛋白質として同定された。しかし、申請者等の過去の研究から、Arr1 が視細胞の生存シグナル伝達、Arr2 が視細胞の死のシグナル伝達に関わる可能性が示唆されていた。そこで、このシグナル伝達経路の解明を目的として研究を開始した。その研究過程において、Arr1, Arr2 の局在を様々な光条件や、変異体でしらべたところ、視覚の分野で今、盛んに議論されている光情報変換に関わる分子のトランスロケーションの研究の分野に貢献できる結果を多数得ることが出来た。そこで、この研究について概要を述べたい。

アレスチンは、暗所では細胞質に局在するが、光によって光受容膜（脊椎動物では外節、無脊椎動物では微絨毛）に移動することが知られていたが、その分子機構については論争があり、まだ解明されていなかった。私達は、免疫抗体法、電気生理、アレスチン GFP を用いた live cell imaging など駆使して、アレスチンがロドプシンの異性化量に対し化学量論的に移動することを示すことに成功した。また、このトランスロケーションが極めて早い反応（time constant <10s）であること、さらに、光情報伝達経路に関わる因子、PLC をコードする norpA、G 蛋白質、Gq、TRP チャンネルの変異体では、このトランスロケーションが著しく遅くなることを見いだした。光情報伝達経路が活性化すると細胞内のカルシウム濃度が上昇するが、このカルシウム濃度の上昇がアレスチントランスロケーションの速度を上げる真のファクターであることも示し、これらの知見を論文にまとめ、Neuron、J. Neuroscience 誌に発表しを行なった。

課題 3) 光感度調節機構としての色素顆粒運動の過程に関わる遺伝子を同定するために、この過程に欠損のある変異体のスクリーニングを行なった。その結果、光を当てても色素顆粒の動かない変異体を複数得ることに成功した。このうちの 1 つ、変異体 M47 では視細胞の形態や光応答は正常であり色素顆粒運動が特異的に欠損していた。この変異体で欠損している遺伝子を同定するために、組換え SNP マッピングと次世代シーケンサーによる全ゲノム再シーケンスを行った結果、候補となる 2 つの点変異を同定

することが出来た。今後は、レスキュー実験により、どちらの変異が原因となっているのかを明らかにし、その後、同定された遺伝子についての詳細な解析を行う予定である。

#### 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. Satoh, T., Inagaki, T., Liu, J., Watanabe, R. and Satoh, A. K. (#: corresponding author) (2013) GPI biosynthesis is essential for Rhodopsin sorting at the trans-Golgi network in *Drosophila* photoreceptors. *Development* 140, 385-94. 査読有
2. Hardie, R. C., Satoh, A. K. and Liu, C-H. (2012) Regulation of arrestin translocation by Ca<sup>2+</sup> and Myosin III in *Drosophila* photoreceptors. *J. Neurosci.*, 32, 9205-16 査読有
3. 佐藤明子 ショウジョウバエ視細胞における色素顆粒運動の分子機構. *生化学* 83, 1032-5 (2011) 査読無
4. Satoh, A. K.#, Xia, H.#, Yan, L., Huang J., Hardie R. C. and Ready, D. F. (#: contribute equally) (2010) Arrestin translocation is stoichiometric to rhodopsin isomerization and accelerated by phototransduction in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 67, 997-1008. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 佐藤卓至, 大場綾, Ziguang Liu, 稲垣壮, 佐藤明子. *Drosophila* dPob はロドプシンの合成中間体の安定化に必要である. 第 83 回日本生化学会大会. 福岡. (2012.12.16)
2. 佐藤卓至, 稲垣壮, Ziguang Liu, 渡辺玲香, 佐藤明子. ショウジョウバエロドプシンの選別輸送には GPI 生合成が必要である. 第 83 回日本動物学会大会. 大阪. (2012.9.13)
3. 佐藤卓至, 大場綾, Ziguang Liu, 稲垣壮, 佐藤明子. dPob はロドプシンのフォールディングに必要である. 第 83 回日本動物学会大会. 大阪. (2012.9.13)

4. 山本詩織, 佐藤卓至, 杉山伸, 尾崎浩一, 佐藤明子. ショウジョウバエ視細胞における色素顆粒運動に関わる因子の変異体探索. 第83回日本動物学会大会. 大阪. (2012.9.13)
5. Satoh, T., Inagaki, T., Liu, J., Watanabe, R. and Satoh, A. K. GPI biosynthesis is essential for the sorting of Rh1 at the trans Golgi network in *Drosophila* photoreceptors. Gordon Research Conference on Visual system development, New London at UAS (2012.8.21)
6. 佐藤明子. The mechanism of Rhodopsin transport to the photoreceptive membrane, rhabdomeres in *Drosophila* photoreceptors. 第82回日本生化学会大会. シンポジウム”オルガネラ研究新地平”京都. (2011.9.23)
7. Satoh, T., Inagaki, T., Watanabe, R. and Satoh, A. K. GPI biosynthesis is essential for the sorting of Rh1 at the trans Golgi network in *Drosophila* photoreceptors. FASEB Summer Research Conference on Protein lipidation, signaling, and membrane domains, Saxton River at UAS (2011.7.27)
8. 佐藤明子. アレスチントランスロケーションは光情報伝達シグナルにより加速される. 第82回日本動物学会大会. 東京. (2010.9.23)
9. 佐藤明子. ロドプシン輸送を阻害する変異体のスクリーニング. 第81回日本動物学会大会. 静岡. (2009.9.18)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：