

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 18日現在

機関番号：38005

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650173

研究課題名（和文）小胞輸送過程に依存した視細胞変性のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism underlying photoreceptor degeneration in response to vesicular fusion defects

研究代表者

政井一郎 (MASAI ICHIRO)

沖縄科学技術大学院大学・神経発生ユニット・准教授

研究者番号：50242087

研究成果の概要（和文）：

ヒトでは遺伝性の視細胞変性疾患が知られている。今までの研究から、視細胞変性と小胞輸送の異常との関連が報告されていたが、その背景にあるメカニズムは不明であった。本研究では、魚類であるゼブラフィッシュを用いて、視細胞変性のメカニズムを研究し、小胞輸送の破綻に反応して細胞死を誘導する因子として **BNip1** を同定した。この成果は、視細胞変性の原因となる新たな仕組みを提示するだけでなく、ヒトにおける遺伝性網膜疾患の病態理解への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：

There are hereditary photoreceptor degeneration diseases in human. While previous studies suggested a connection between defects in vesicular transport and photoreceptor degeneration, the mechanism behind this link remained elusive. In this study, we investigated the mechanism underlying photoreceptor degeneration using zebrafish and identified BNip1 as a factor that induces cell death in response to vesicular transport defects. This finding uncovers a novel mechanism of photoreceptor degeneration and may advance our understanding of pathological process of human genetic retinal disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学、脳神経疾患、視細胞変性、遺伝疾患、アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトでは、網膜色素変性症など視細胞変性を示す遺伝病が知られている。最近のヒトゲノムの解読によって、それらの責任遺伝子が明らかにされてきた。2013年現在、241の突然変異座が染色体上にマップされ、そのうち201について責任遺伝子が同定されている。これらの変異遺伝子がコードする蛋白質は、大まかに、光受容機構に関わる蛋白質、レチノイド代謝関連蛋白質、外節を形成する光受容膜の維持に関わる蛋白質、視細胞の特異化

に関わる蛋白質の4つのグループに分類される。しかし、これらに分類されない蛋白質もあり、上記を含めた蛋白質の機能解明は視細胞変性へ至る病態を理解する上で重要なテーマとなっている。また、多くのケースで、蛋白質の輸送異常との関連が示唆されている。例えば、視物質であるロドプシンの突然変異は常染色体優性の網膜色素変性症を引き起こすが、ロドプシンが小胞体から運ばれない変異 Pro23His や、光受容膜から成る外節に輸送されない変異 Glu344Ter が報告さ

れている。また、視細胞結合繊毛を介した外節への輸送機構に破綻をきたすと、視細胞変性を引き起こす。しかし、蛋白質の輸送異常がどのように視細胞変性を引き起こすか、そのメカニズムは不明である。

我々は視細胞変性のメカニズムを解明するために、ゼブラフィッシュを用いて大規模な突然変異体のスクリーニングを行い、視細胞が変性する突然変異体を同定した(Nishiwaki et al., (2008) *Mech. Dev.* **125**, 932-946.)。そのうちのひとつである *corona* (*coa*)突然変異体では、視細胞は一旦特異化されるが、視物質などの光受容蛋白質は外節の光受容膜まで輸送されず、細胞死を起こす。我々は、本研究が開始する前年に、*coa* 突然変異体の責任遺伝子の同定に成功し、それが  $\beta$ -SNAP (soluble NSF attachment protein; NSF は N-ethyl-maleimide-sensitive factor の略) をコードしていることを発見した。 $\beta$ -SNAP は細胞内で輸送小胞と膜オルガネラの融合過程を制御する蛋白質であり、その機能欠損によって小胞輸送を介した細胞内物流が低下すると考えられる。このことから、*coa* 突然変異体は、小胞輸送の異常による視細胞変性のメカニズムを研究する良いモデルとなると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、小胞輸送の異常による視細胞変性のメカニズムを明らかにすることを目的とする。ここでは、 $\beta$ -SNAP に突然変異が起きたゼブラフィッシュ *coa* 突然変異体に着目し、視細胞変性過程を分子レベルで解明する。また、細胞内の輸送異常が報告されているヒトのロドプシン突然変異 Pro23His に着目し、 $\beta$ -SNAP の機能欠損と同じ経路を介して細胞死が誘導されるかどうかを検証する。

## 3. 研究の方法

アポトーシス(細胞の自殺)は、Bcl2ファミリーに属するpro-apoptotic蛋白質であるBax/Bakを介して誘導される。Bcl2/BclXLはanti-apoptotic蛋白質として、Bax/Bakを抑制することで、アポトーシスを抑制する。さらに、多くのBH3-only蛋白質が同定されており、これらはBcl2/BclxLを抑制し、Bax/Bakを活性化することで、pro-apoptotic蛋白質として機能する。我々は、*coa*突然変異体にBcl2を強制的に発現することで、視細胞変性を抑制できるデータを得ており、*coa*突然変異体ではアポトーシスを介して視細胞変性が起きると考えられる。本研究では、*coa*突然変異体における細胞死経路を明確にする目的で、*coa*突然変異体で活性化しているBcl2ファミリー蛋白質を探索する。また、*coa*突然変異体の視細胞では小胞輸送の破綻が示唆されることから、細胞内の膜オルガネラの異常を検証する。ここでは

膜オルガネラのマーカーを用いた組織染色と電子顕微鏡観察を行い、顕著に影響を受ける膜オルガネラを同定することで、細胞死誘導の発信源となる膜オルガネラを絞り込む。

ヒトでは網膜色素変性症など遺伝性網膜疾患が知られている。中でも、ロドプシン遺伝子は有名で、100以上の突然変異が同定されている。本研究では、輸送異常が報告されているロドプシン変異の中で、 $\beta$ -SNAPの機能欠損による細胞死と同じ機構を介して変性を起こすものがあるか検証する。最初に、米国の患者の中で最も多いロドプシン変異であるPro23Hisに着目する。この変異をもつロドプシンは外節の光受容膜まで輸送されず、小胞体で蓄積することが報告されている。ここでは、ゼブラフィッシュにおいてこの変異をもつトランスジェニック系統を作製し、視細胞変性を調べるとともに、*coa* 突然変異体と共通のアポトーシス経路を介して細胞死が起きるか検証する。

## 4. 研究成果

*coa* 突然変異体での視細胞変性過程を明らかにするために、膜オルガネラを可視化した。ここでは小胞体とゴルジ体に局在化できるアミノ酸配列と融合した蛍光蛋白質を、網膜で発現させた。その結果、*coa* 突然変異体の視細胞においてゴルジ体のシグナルが減少していることが観察された。さらに電子顕微鏡観察でも、ゴルジ体と、光受容膜から構成される外節の形成不全が観察された。このことから、*coa* 突然変異体の視細胞では、ゴルジ体や外節などの膜オルガネラの維持が損なわれることが明らかになった。

次に、*coa* 突然変異体の視細胞変性におけるアポトーシスの関与を調べた。ゼブラフィッシュでは2つの *bax* 遺伝子、*bax1* と *bax2* が存在し、*bax2* mRNA は初期の受精卵のみで発現し、*bax1* mRNA は発生過程を通じて発現している。Bax1 と Bax2 のモルフォリノアンチセンスを *coa* 突然変異体に導入した結果、Bax1 のアンチセンスでのみ、その視細胞変性は抑制された。このことから、*coa* 突然変異体では、Bax1 を介して、アポトーシスが誘導されることが明らかになった。

さらに、Bax1 の上流で働く BH3-only 蛋白質を明らかにするために、候補となる BH3-only 蛋白質をモルフォリノアンチセンスで阻害し、*coa* 突然変異体における視細胞変性をレスキューできるか調べた。ヒトの培養細胞を用いた研究から、 $\alpha$ -SNAP の強制発現によって BH3-only 蛋白質である BNip1 の細胞死活性を抑制できることが報告されている(Nakajima et al., 2004 *EMBO J.* **23**, 3216-3226.)。ヒトの $\alpha$ -SNAP とゼブラフィッシュの $\beta$ -SNAP はアミノ酸レベルで81%の相同性があるので、*coa* 突然変異体における

BNip1 の関与を調べた。ゼブラフィッシュでは2つの *bnip1* 遺伝子 *bnip1a* と *bnip1b* がデータベースに登録されている。そこで、BNip1a と BNip1b の機能阻害を行ったところ、協調して *coa* 突然変異体の視細胞変性を抑制した。これらの結果から、*coa* 突然変異体の視細胞変性はBNip1に依存することが明らかになった。

小胞輸送は、ドナーの膜オルガネラから小胞が出芽し、標的となる膜オルガネラへ輸送され、融合するステップから成っている。輸送小胞と標的オルガネラ膜との融合過程は、SNAP receptor (SNARE) と呼ばれる一群の蛋白質で制御されている。SNARE 蛋白質は vesicle-membrane SNARE (v-SNARE) と target-membrane SNARE (t-SNARE) に分類される。輸送小胞の融合過程は、輸送小胞上にある1つの v-SNARE と標的膜上に存在する3つの t-SNARE が相互作用することで開始され、膜融合を経て、cis-SNARE 複合体と呼ばれる t-SNARE-v-SNARE 複合体が形成される。*coa* 突然変異体の責任遺伝子である  $\beta$ -SNAP はこの cis-SNARE 複合体に結合し、ATPase である NSF を誘導し、cis-SNARE 複合体の解離を担うことで、個々の SNARE 蛋白質をリサイクルし、次の輸送小胞の融合を可能にする。*coa* 突然変異体では  $\beta$ -SNAP の活性低下により、すべての cis-SNARE 複合体が解離できず、蓄積することが予想される。BNip1 は、ゴルジ体から小胞体への逆行性輸送を制御する syntaxin18 複合体の t-SNARE 因子であることから、syntaxin18 cis-SNARE 複合体の蓄積が、BNip1 の細胞死誘導を促進する可能性が考えられた。実際に、syntaxin18 の cis-SNARE 複合体の形成を阻害すると、*coa* 突然変異体における視細胞変性が抑制された。以上の結果から、BNip1 は通常、SNARE の一員として小胞輸送の融合を制御しているが、 $\beta$ -SNAP の活性が低下すると、syntaxin18 cis-SNARE 複合体が蓄積し、BNip1 の細胞死活性が上がり、アポトーシスが起きることが明らかになった。 $\beta$ -SNAP の活性低下は輸送小胞の破綻につながるため、BNip1 は小胞輸送の破綻に反応して、アポトーシスを誘導する警報装置として機能すると考えられる。これらの研究成果は、学術雑誌である *Developmental Cell* に発表した。

さらに、Pro23His 変異ロドプシンによる視細胞変性と BNip1 との関連を調べる目的で、この変異ロドプシンをもつトランスジェニック系統を複数作製し、網膜を組織学的に調べたところ、桿体が減少していることが観察された。今後、BNip1 や小胞体ストレスとの関連を検証していく予定である。

## 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)

国際誌 (査読有り) 2件

- (1) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. (2013). The BH3-only SNARE BNip1 mediates photoreceptor apoptosis in response to vesicular fusion defects. *Dev. Cell* 25, 374 – 387.

DOI: 10.1016/j.devcel.2013.04.015

- (2) Vogalis, F., Shiraki, T., Kojima, D., Wada, Y., Nishiwaki, Y., Jarvinen, J. L. P., Sugiyama, J., Kawakami, K., Masai, I., Kawamura, S., Fukada, Y., Lamb, T. D. (2011) Ectopic expression of cone-specific G-protein-coupled receptor kinase GRK7 in zebrafish rods leads to lower photosensitivity and altered response. *J. Physiol.* 589, 2321 – 2348.

DOI: 10.1113/jphysiol.2010.204156

国内総説誌 (査読無し) (2件)

- (1) 政井一郎 (2011). ゼブラフィッシュ網膜モデルから見えてくる神経細胞死の制御機構 *実験医学* 29, 521–525.
- (2) 政井一郎 (2010). P53 を介した細胞死の制御メカニズム *実験医学 (増刊 細胞死研究 総集編)* 28, 1042–1047.

[学会発表] (計12件)

国際学会口頭発表 2件

- (1) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. Genetic mutation of beta-SNAP causes photoreceptor degeneration through the activation of the BH3-only SNARE, BNip1. 10<sup>th</sup> International Conference Zebrafish Development and Genetics, Madison, USA, 20-24 June 2012.
- (2) Masai, I. Molecular mechanism that transforms defects in intracellular vesicular transport into apoptosis in zebrafish photoreceptors. 5th Asia-Oceania zebrafish international meeting, China National Convention Center, Beijing, China, 26-29 August 2011.

国際学会ポスター発表 3件

- (1) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y.,

Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. Genetic mutation of beta-SNAP causes photoreceptor degeneration through the activation of the BH3-only SNARE, BNip1. APDBC Taiwan 2012 Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012, Taipei Innovation City Convention Center, Taipei, Taiwan, 5-8 October, 2012.

- (2) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. The BH3-only SNARE of syntaxin18, BNip1, mediates photoreceptor apoptosis in response to vesicular fusion defects. Gordon research conference – visual system development. Colby-Sawyer College, New London, NH. August 19-24, 2012
- (3) Nishiwaki, Y., Suzuki, S., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Mochizuki, T., Masai, I. Mutation of beta-SNAP induces a mitochondria-dependent apoptosis in zebrafish photoreceptors. 7th European Zebrafish Meeting, Edinburgh, Scotland, 5-9 June 2011.

国内学会口頭発表 5件

- (1) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. Syntaxin18 cis-SNARE complex is a novel alarm factor that detects vesicular transport defects. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. Matsue, Shimane, Japan. 28-31 May 2013.
- (2) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. The BH3-only SNARE of syntaxin18, BNip1, is a mediator of photoreceptor apoptosis in response to vesicular fusion defects. The 35<sup>th</sup> annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Fukuoka, Japan. 11-14 December, 2012.
- (3) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. Genetic mutation of beta-SNAP causes photoreceptor degeneration through the activation of the BH3-only SNARE, BNip1. The 18<sup>th</sup> Japanese Medaka and zebrafish meeting. Kyoto, Japan, 22-23

September, 2012.

- (4) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. The BH3-only SNARE of syntaxin18, BNip1, is a mediator of photoreceptor apoptosis in response to vesicular fusion defects. Neuroscience 2012. The 35<sup>th</sup> annual meeting of the Japan Neuroscience Society. Nagoya, Japan. 18-21 September, 2012.
- (5) Nishiwaki, Y., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Oguri, E., Nakamura, S., Suzuki, S., Yuasa-Kawada, J., Kinoshita-Kawada, M., Mochizuki, T., and Masai, I. Genetic mutation of beta-SNAP causes photoreceptor degeneration through the activation of the BH3-only SNARE, BNip1. Joint meeting of the 45<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese society of Developmental Biologists & the 64<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese society of Cell Biology. Kobe, Japan, 28-31 May, 2012.

国内学会ポスター発表 2件

- (1) Iribarne, M., Nishiwaki, Y., and Masai, I. Characterization of a zebrafish mutant showing cone photoreceptor degeneration. The 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists Matsue, Shimane, Japan. 28-31 May 2013.
- (2) Nishiwaki, Y., Suzuki, S., Yoshizawa, A., Kojima, Y., Mochizuki, T., Masai, I. A zebrafish corona mutation induces a Bcl2-dependent apoptosis in photoreceptor. 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Okinawa Convention Center (Ginowan City), 18-21 May 2011

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
研究室のホームページ  
<https://groups.oist.jp/ja/dnu>

論文の成果のページ  
<http://www.oist.jp/ja/news-center/press-releases/10744>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

政井一郎 (MASAI ICHIRO)  
沖縄科学技術大学院大学・神経発生ユニット・准教授  
研究者番号：50242087

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

西脇優子 (NISHIWAKI YUKO)  
沖縄科学技術大学院大学・神経発生ユニット・研究員  
研究者番号：20360620