

特異的膜輸送に關与する Sec1/Munc-18 ファミリーの
構造機能相關

(課題番号 14580748)

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))
研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 安藤 恵子

(東京女子医科大学医学部助手)



はしがき

近年 SNARE 蛋白質がシナプス小胞の開口分泌だけではなくオルガネラ間の小胞輸送においても中心的役割を果たすことが明らかになってきた。申請者らは線虫 *unc-18* の分子遺伝学的解析を行い *unc-18* が神経伝達物質放出に必須の蛋白質であることを明らかにした (Gengyo-Ando et al., *Neuron* 11: 703-711, 1993)。*unc-18* は進化的に保存された遺伝子ファミリー (Sec1/Munc-18 ファミリー) を形成しており、*in vitro* でシンタキシンと結合し SNARE 複合体形成を阻害することから膜融合制御に直接関わる因子として注目されている。

線虫の逆遺伝学的解析法として RNA 干渉法による遺伝子ノックダウン法と欠失変異体分離による遺伝子ノックアウト法がある。RNA 干渉法は手法の簡便さからゲノムワイドな機能解析が行われており、遺伝子機能解析の 1 次情報として有効であるが、遺伝子によって効果が異なるという RNA 干渉法の問題点を常に考慮する必要がある。遺伝子ノックアウト法は特定の遺伝子配列を欠失させているため微妙な表現型に関しても再現性のあるデータがとれる可能性が高く、RNA 干渉法では適用できないトランスジェニック解析を用いた詳細な遺伝子機能解析が行えるという利点がある一方、スクリーニング効率の低さ (1-2 ノックアウト/半年) からゲノム機能解析には向かないとされてきた。申請者らは過去 5 年間で欠失変異体分離法の効率化とシステム整備を行い

(Gengyo-Ando & Mitani BBRC: 2000)、現在 15-20 遺伝子ノックアウト／週
のスピードで変異体を取得している。これは国内のみならず国外においても例
をみないハイスループットなシステムであり、この手法を用いて感覚統合と学
習 (Ishihara et al., Cell : 2002), 糖鎖機能(Mizuguchi et al. Nature :2003)、
アポトーシス(Wang et al., Science: 2003) などのさまざまな生命現象に関わ
る遺伝子機能解析を行っている。Sec1/Munc-18 の系統的な機能解析を行うた
めこの方法を用いてゲノム配列から予測される Sec1/Munc-18 ファミリーの
ノックアウト変異体を作成し、詳細な表現型解析が進行中である。その過程で
酵母の液胞への膜輸送異常突然変異体として同定された vps45 の線虫ホモロ
グ(Ce-vps45)変異体のリソソーム異常を示すことを見出した。さらに CE-
VPS45 を神経細胞で強制発現しても unc-18 変異体の神経伝達物質放出異常を
レスキューせず、一方 UNC-18 をすべての細胞で強制発現しても Ce-vps45 変
異体のリソソーム異常をレスキューしないことを明らかにした。「膜輸送の特
異性に関わっている分子は何か？」という小胞輸送の根源的な問いに対して
SNARE 蛋白質がその候補として報告されているが(McNew et al.Nature,
2000)、 これらの結果から Sec1/Munc-18 ファミリーも膜輸送の特異性を決
定する重要な因子であるという仮説を導いた。

そこで本研究課題では①その仮説を検証し、②機能ドメインと既知の特
異性決定因子であるシンタキシン結合ドメインとの構造機能相関を明らかにす
るため、unc-18 と Ce-vps45 とのキメラ遺伝子を用いた機能相補実験を行い、
プレシナプス膜（細胞膜）およびリソソーム膜への膜輸送の特異性に関わる

Sec1/Munc-18 ファミリーの機能ドメインを決定する。さらにそれぞれのキメラ蛋白質や欠失変異体蛋白質のシンタキシンとの結合活性を Two-Hybrid システムで解析した。

Sec1/Munc-18 とシンタキシン複合体の結晶構造解析が Sec1/Munc-18 が構造的に 3 つのドメインから構成され、特定のドメインでシンタキシンと相互作用することが推定された (Misura et al., Nature, 2000)。細胞内の異なる膜輸送経路で働く Sec1/Munc-18 蛋白質の機能発現に関わるドメイン構造とシンタキシンとの相互作用の関係を個体レベルで解析した例は現時点では存在しない。またノックアウト変異体を用いたキメラ解析は開口放出に関与する多くのファミリーにも共通の方法論を適用できると考えられる。

小胞輸送の分子メカニズムに関する研究は主に酵母の分子遺伝学アプローチと輸送反応の試験管内再構成系による生化学的アプローチにより進められてきた。線虫は神経細胞、腸管細胞など特殊に分化した分泌組織を備えており、逆遺伝学的解析やトランスジェニック解析を簡便に行えるため、調節性分泌研究の強力なモデル動物である。線虫を用いた個体レベルでの機能解析により、現在までに蓄積されてきた膨大な知見を多細胞系で検証し、小胞輸送のより高次な生理的意義を明らかにしていくことは極めて重要であると考えられる。

研究組織、研究経費

研究組織

研究代表者：安藤恵子（東京女子医科大学医学部助手）

研究分担者：なし

研究経費

平成14年度	1,300千円
平成15年度	1,000千円
合計	2,300千円

研究成果

リソソームは動物細胞の分解コンパートメントであり、細胞内の不要な物質の分解やエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれた物質の分解を行うことで、発生・分化、形態形成、恒常性維持および外界からのシグナル伝達などの多彩な細胞機能を支える重要なオルガネラであるが、リソソーム系の構築と機能については不明な点が多い。酵母や植物では液胞がリソソームと機能的に相同なオルガネラであり、液胞蛋白質が細胞表層へミスソートする変異体のスクリーニングによりゴルジ体から液胞への輸送に関わる酵母 vps 遺伝子群が同定され、液胞の形態により 6 つのクラスに分類されている。さまざまな動植物のゲノム情報から vps 遺伝子群は真核生物に広く保存されていることが明らかになっている。本研究課題では Sec1/Munc-18 ファミリーの 1 つである vps45 に着目し線虫 vps45 の機能解析を行った。その結果 vps45 の線虫ホモログがリソソームの形態形成やゴルジ体からリソソームへの膜輸送などの酵母からの酵母から予測される機能だけではなく、液相エンドサイトーシスやレセプター仲介エンドサイトーシスにも必須の機能を持つことを発見し、多細胞系での検証の重要性を示し国際的に高い評価を得ることができた(第 14 回線虫国際会議ポスター賞)。以下に実験結果を示す。

1. Ce-vps45 の遺伝子構造とアミノ酸配列

Ce-vps45 の全長 cDNA 塩基配列を RT-PCR によりクローニングし、

塩基配列を決定した。cDNA 塩基配列から予測されるアミノ酸配列と酵母 vps45 およびヒト vps45 とのホモロジーはそれぞれ 38%、47%であり、Ce-vps45 は線虫 vps45 をコードしていると推測された。

2. Ce-vps45 の発現解析

Ce-vps45::EGFP 融合遺伝子をレポーターに用いたトランスジェニック解析により Ce-vps45 遺伝子の発現パターンを調べた。unc-18 は神経細胞特異的な発現パターンを示すのに対して Ce-vps45/EGFP 融合蛋白質はほぼすべての発生ステージにわたり神経、筋肉、表皮、腸管等多くの組織で発現が認められた。Ce-vps45 のこのような ubiquitous な発現パターンは vps45 がリソソームへの膜輸送に関与するという知見と矛盾しないように思われる。また、Ce-vps45/EGFP はリソソームの発達している腸管細胞で特に強く発現していた。Ce-vps45 を腸管特異的に発現させることで、Ce-vps45 変異体（後述）の表現型が回復することから、この遺伝子が主に腸管細胞で働くことが示唆された。

3. Ce-vps45 の欠失変異体の分離と表現型解析

Ce-vps45 の機能を明らかにするため TMP/UV 法を用いてコード領域に 1.2kb の欠失を持つ変異体 tm246 を分離した。欠失は開始コドンを含んでいるため、おそらく null 型変異であると推測された。遺伝学的解析から tm246 は母性効果のある温度感受性劣性幼虫致死変異であることを見出した。tm246 ホモ

接合体は低温生育下（15℃）では生存可能であるが、高温生育下（25℃）ではほぼL1期に発生停止となった。この時期は自家蛍光物質の蓄積などで推測されるリソソームが発達する時期に一致している。また、制限温度で生育した変異体の腸管細胞内ではリソソームマーカである線虫カテプシンD/EGFP融合蛋白質の異常な aggregates が認められ、リソソーム経路の機能障害が示唆された。

さらにGFPをタグにすることで可視化したピテロジェニンの卵細胞への取り込み（レセプター仲介エンドサイトーシス）、偽体腔内に強制発現させたGFPのマクロファージ様細胞への取り込み（液相エンドサイトーシス）を変異体バックグラウンドで観察した。その結果線虫vps45は酵母vps45から予測されるゴルジ体からリソソームへの輸送だけではなくエンドサイトーシスにも必須の機能をもつことを発見した。エンドサイトーシスのどの過程に異常があるのかをオルガネラマーカを用いて検討中である。

4. Syntaxinとの相互作用の検定

SyntaxinメンバーであるTlg2との相互作用に関わる線虫vps45のドメインを明らかにするためyeast two hybridシステムによりdeletion studyおよびchimera studyを行った。Sec1/Munc-18ファミリーは3つのドメインから構成されているためN末およびC末から各ドメインを欠失させたconstructおよ

びunc-18とのキメラ体を各種作成し解析した。その結果ドメイン1単独あるいは全長タンパク質のみTlg2との相互作用能があることがわかった。この相互作用能はドメイン1内のD28N変異により消失した。

5. 機能相補実験系の確立と検証

異なる膜輸送経路で働く Sec1Munc-18 ファミリー (unc-18:ゴルジ体からプレシナプス膜、Ce-vps45: ゴルジ体からリソソーム) の機能的互換性を調べるため、変異体を用いた機能相補実験系を確立した。Ce-vps45 遺伝子のプロモーター/エンハンサー配列をゲノムからクローニングし、その下流にCe-vps45 cDNA のコード領域を挿入したレスキュー用発現プラスミドを作成した。このプラスミドを Ce-vps45 変異体内で発現させたトランスジェニック個体は制限温度でも生存可能であった。同様に unc-18 遺伝子プロモーター/エンハンサーの下流に unc-18 cDNA のコード領域を挿入したレスキュー用発現プラスミドも作成し、unc-18 変異体のレスキュー活性を確認した。表現型のレスキュー活性は unc-18 については運動異常の回復、Ce-vps45 については制限温度下での生存を指標とするため、アッセイが非常に簡便であるという利点がある。このアッセイ系を用いて unc-18 と Ce-vps45 の機能的互換性を調べるために Ce-vps45 を unc-18 変異体の神経細胞で、unc-18 を Ce-vps45 変異体のさまざまな細胞で発現させたところ、お互いに変異体のレスキュー活性は認められなかった。一方マウス vps45(m-vps45)は Ce-vps45(tm246)

の致死表現型を機能相補することを見出した。したがって異なる膜輸送経路で働くメンバーについては機能的互換性はなく、リソソーム経路で働く vps45 ホモログについては異種間でも機能的互換性があることがわかった。

さらに線虫vps45とTlg2との相互作用がどの輸送経路に関わっているのかを解明するためドメイン1のみの欠失蛋白質をマクロファージ様細胞に過剰発現させたところ液相エンドサイトーシスに異常が観察された。このように線虫Tlg2との相互作用能を持つ欠失蛋白質がエンドサイトーシスに関して dominant negative効果を示すことから線虫vps45はTlg2と共にエンドサイトーシス経路に関わることが示唆された。さらにTlg2との相互作用能を消失した D28N蛋白質の生理学的活性について検討している。

研究発表

発表論文

1. Hanazawa M, Kawasaki I, Kunitomo H, Gengyo-Ando K, Bennett KL, Mitani S, Iino Y. Mech Dev. 2004 Mar;121(3):213-24. The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1.
2. Wang X, Wu YC, Fadok VA, Lee MC, Gengyo-Ando K, Cheng LC, Ledwich D, Hsu PK, Chen JY, Chou BK, Henson P, Mitani S, Xue D. Science. 2003 Nov 28;302(5650):1563-6. Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12.
3. Mizuguchi S, Uyama T, Kitagawa H, Nomura KH, Dejima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Sugahara K, Nomura K. Nature. 2003 May 22;423(6938):443-8. Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*.
4. Ogura K, Kishimoto N, Mitani S, Gengyo-Ando K, Kohara Y. Development. 2003 Jun;130(11):2495-503. Translational control of maternal glp-1 mRNA by POS-1 and its interacting protein SPN-4 in *Caenorhabditis elegans*.

5. Kimura Y, Corcoran EE, Eto K, Gengyo-Ando K, Muramatsu MA, Kobayashi R, Freedman JH, Mitani S, Hagiwara M, Means AR, Tokumitsu H. A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*. EMBO Rep. 2002 Oct;3(10):962-6. Epub 2002 Sep 13.
6. Ishihara T, Iino Y, Mohri A, Mori I, Gengyo-Ando K, Mitani S, Katsura I. Cell. 2002 May 31;109(5):639-49. HEN-1, a secretory protein with an LDL receptor motif, regulates sensory integration and learning in *Caenorhabditis elegans*.
7. Iwahashi J, Kawasaki I, Kohara Y, Gengyo-Ando K, Mitani S, Ohshima Y, Hamada N, Hara K, Kashiwagi T, Toyoda T. Biochem Biophys Res Commun. 2002 May 3;293(2):698-704. *Caenorhabditis elegans* reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis.

総説

1. 安藤恵子 (2004): ホスファチジルセリンレセプター (PSR) を介したアポトーシス細胞貪食の分子機構. 実験医学22 (4): 502.
2. Mizuguchi S, Nomura KH, Dejima K, Gengyo-Ando K, Mitani S, Uyama T, Kitagawa H, Sugahara K, Nomura K. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 2004 Feb;49(2):141-7. [Chondroitin sugars in embryonic cell division of the nematode *C. elegans*]

著書

1. 三谷昌平、安藤恵子 (2003): 「遺伝子破壊変異体の取得」線虫ラボマニ

ユアル、三谷昌平編、シュプリンガー・フェアラーク社、p 99-114.

学会発表

国内学会発表

1. Keiko Gengyo-Ando, Etsuko Machiyama, Sachiko Noguchi, Shohei Mitani : Functional analysis of the C. elegans Sec1/Munc-18 family involved in membrane trafficking . Neurosci Res 46 (Suppl) S147.
2. 安藤恵子、町山悦子、野口幸子、三谷昌平 ゴルジ体からリソソームへの膜輸送に関与する線虫 vps45 ホモログの機能解析、第79回日本生理学会大会. 2002年3月、広島
3. Gengyo-Ando, K., Machiyama, E., Noguchi, S., Mitani, S. Analysis of the C. elegans Sec1/Munc-18 family involved in membrane trafficking. 第3回 C.エレガンス日本集会、2002年8月、名古屋

国際学会発表

4. Mitani, Shohei; * Gengyo-Ando, Keiko; Hanaka, Satoko; The Mitani Laboratory, Members Of. Isolation And Distribution Of C. Elegans Deletion Mutants: A Custom Screening Service By National Bioresource Project In Japan. (4) 2003 International Worm Meeting. Ucla 2003. 6
5. Gengyo-Ando, Keiko; * Machiyama, Etsuko; Noguchi, Sachiko; Mitani, Shohei. Analyzing The C. Elegans Sec1/Munc-18 Family Genes Involved In Membrane Trafficking By Reverse Genetic

Approach.(767b) 2003 International Worm Meeting. Ucla 2003. 6

6. Allan, R., Barstead, R., Edgley, M., Gengyo-Ando, K., Holmes, J., Hughes, M., Jones, S., Kohara, Y., Lansdale, M., Liu, L., Maydan, J., McKay, S., Machiyama, E., Mitani, S., Moerman, D., Moulder, G., Nisha, M., Noguchi, S., Osborn, J., Rankin, A., Rezanian, N., Robertson, J., Rogers, B., Shen, B., Tamura, M., Viswanathan, M. The C. elegans Knockout Consortium: Interim Report. Midwest Worm Meeting, St. Louis, 2002 年 6 月