

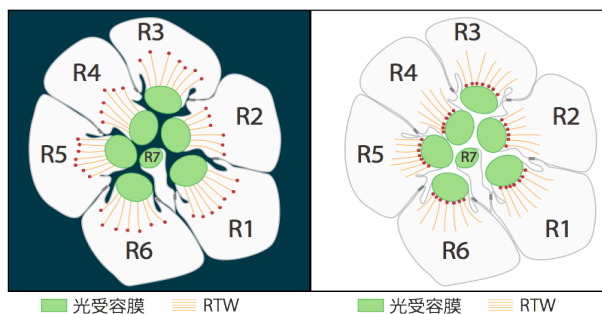
明暗順応をつかさどる色素顆粒運動の分子機構の解明

広島大学大学院 総合科学研究科

佐藤 明子

1. 背景

1つの細胞の内部には様々なオルガネラが存在し、細胞の生存や機能に重要な役割を果たしている。各々のオルガネラの機能と構造に関しては、これまで多くの研究が行われている。近年、これらのオルガネラの多くが細胞内で細胞骨格などにより適切に配置され、また時に、厳密に制御されて位置を変動することがわかってきた。ショウジョウバエ視細胞の色素顆粒は明暗で位置が異なり光順応に貢献していることが古くから知られていた(図1)。色素顆粒は明所では光受容膜の直下にあり、光受容膜内に侵入してきた光を吸収・散乱することで、実行光量を低下させる。暗所では光受容膜から離れ、そのため光受容膜内に侵入してきた光は、密度の高い光受容膜内に留まり、最終的に光受容蛋白質ロドプシンに吸収され光応答を生じる。この色素顆粒の運動により暗所では明所よりも約7倍光感度が上昇する。最近の申請者の研究から、光により細胞内のカルシウム濃度が上昇すると色素顆粒に結合しているミオシンVが活性化して、光受容膜基部へと移動することで、色素顆粒が移動することが分かってきた。しかし、カルシウムがどのようにミオシンVを活性化するのか、また色素顆粒とミオシンVをつなぐ分子機構の詳細は殆ど分かっていない。そこで、スクリーニングにより、この過程に関わると考えられる未知の因子を同定し、その解析により色素顆粒運動の分子機構の解明を目指した。



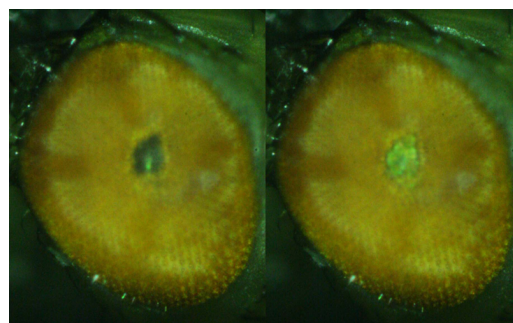
暗順応時

明順応時

図1. ショウジョウバエ視細胞における色素顆粒の光依存的運動。暗順応時は色素顆粒(赤い点)は光受容膜基部から伸びているアクチン線維(RTW)の外側に並んでいる。光があたると色素顆粒が光受容膜の直下に移動する。

2. 方法

光依存的色素顆粒運動に必要な因子を同定するために、この過程に欠損のある新規変異体の単離を行う。光依存的色素顆粒運動に関わる分子の変異体の中にはミオシンV変異体のように致死性のものも含まれると考えられる。FLP/FRTモザイク法の改変型、EGUF/hid法を用いると、網膜以外の組織はすべてヘテロ接合体だが、網膜のすべての細胞がホモ接合体の細胞からなる個体を作成でき、致死性の変異についてもスクリーニング可能である。EMS処理により点変異を導入した後、EGUF/hid法を用いて網膜全体がホモ接合体細胞からなるF1世代を作成し、DPP(図2)を利用して色素顆粒の運動能を観察することでスクリーニングを行った。DPPはハエを生かしたまま観察できるので、観察の結果、光依存的色素顆粒運動に異常があるハエのみ系統化を行うことができる。そのため、ハエ飼育のコストを費用と労働の両面において大幅に縮小できる。系統化したハエはもう一度DPP観察し明順応・暗順応に見られた異常の再現性を確認した後、2次スクリーニン



暗順応時

明順応時

図2. 生きたハエの複眼を外から落射顕微鏡観察すると、複眼中央部の焦点の深い部分に大きな個眼様の虚像(DPP: deep pseudopupil)が観察される。暗順応し色素顆粒がRTWの外側に並んでいるときは黒いDPP(左)、光により色素顆粒が光受容膜の直下に移動したときは緑色に反射するDPP(右)が観察される。反射光の強さが光受容膜直下に移動してきた色素顆粒の量を反映する。

グとして、光反応による網膜電位(ERG)の変化を測定し、変異体の光応答の速度や大きさを検討した。光応答に異常を示す変異体では、その欠損している遺伝子が色素顆粒運動に直接関与しないにもかかわらず色素顆粒運動の異常という表現型を示すため、このような変異体を除外した。

3. 結果 研究成果

1) 色素顆粒の移動の変異体のスクリーニング

方法で述べた一次スクリーニング(DPPの光量変化)は、第2染色体右腕に変異導入された1454系統、および、第3染色体右腕に変異導入された1553系統について行った。この結果、第2染色体右腕に変異導入された系統93系統、および、第3染色体右腕に変異導入された系統8系統のDPPの光量変化が見られない変異体が得られた。他の染色体腕に導入された変異に由来するDPP光量変化の異常や、表現型が復帰した系統を排除するため、これらの変異体について再度、変異ホモ接合体細胞により構成される網膜をもつショウジョウバエを作成し、DPPの光量変化を観察し、再現性のみられた変異体を選抜した結果、第2染色体右腕に変異導入された系統3系統、および、第3染色体右腕に変異導入された系統3系統が得られた。

次に二次スクリーニングとして、これらの6系統についてERGを測定したところ、3系統(変異体3, 変異体8, 変異体47)で正常な応答が観察された。これらの3系統を色素顆粒運動の変異体の候補と考え、解析を進めた。

2) 変異体3, 変異体8, 変異体47の表現型解析

スクリーニングで得られた、光依存的色素顆粒運動が阻害されている可能性のある3つの変異体について、FLP/FRT法によりモザイク網膜を作成し、免疫組織化学および電子顕微鏡観察を行い、表現型を詳細に解析した。

変異体3について電子顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡による細胞構造の観察を行ったところ網膜変性がおこることがわかった。網膜変性が引き起こされる場合、色素顆粒の移動の欠損の評価が難しくなるため、この変異体についてはこれ以上の解析を行わなかった。

変異体8は、電子顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡による細胞構造の観察を行ったところ、ハイポモルフ変異体であるMyosinV^{KG04384}変異体で報告されている異所的な感桿分体を所々に形成していることがわかった。そこで、色素顆粒の移動に関して変異体8とMyosinV^{KG04384}変異体との相補性検定を行った結果、互いに相補しないことがわかった。次に、抗体染色によりMyosinVの発現量および細胞内局在の観察を行った結果、変異体8においてMyosinVの発現量が著しく減少していることがわかった。さらに、ウェスタンブロットによる蛋白質発現量の解析結果からも、変異体8においてMyosinVの発現量が著しく減少していることが示され、変異体8がMyosinVの変異体であることが強く示唆された。

変異体47は、非常に重要な観察結果が得られたので、詳細に述べたい。まず、視細胞内での色素顆粒の局在を詳細に調べるため、電子顕微鏡を用いて観察した。ショウジョウバエを一晩暗順応させた後、光を照射して数分以内に固定し電子顕微鏡で個眼を観察すると、野生型では感桿分体の細胞質面直下に色素顆粒が局在するが、変異体47では色素顆粒は感桿分体の細胞質面直下にはほとんど観察されず、野生型暗所での局在部位に留まっていた。このことから、変異体47視細胞では、色素顆粒が全く移動しないことが分かった。次に、間接蛍光抗体法により、色素顆粒の移動に必要なMyosinVの局在を観察した。FLP/FRTモザイク法を利用して、変異型視細胞と野生型視細胞をモザイク状に持つ網膜を作成し、暗順応した後、光を照射して数分以内に解剖・固定し、抗MyosinV抗体と抗ロドプシン抗体を用いて二重染色し、これら2つの蛋白質の発現量や局在を調べた。野生型視細胞にはマーカーとしてRFPを発現させた。明条件下で固定した野生型視細胞では、MyosinVは、感桿分体の細胞質面直下に局在する。変異体47においても野生型と同様に、MyosinVは感桿分体の細胞質面直下に観察された。すなわち、変異体47においてMyosinVは正常に移動することが分かった。この結果は、変異体47で欠損している遺伝子産物が、本来、色素顆粒をMyoVを繋ぐ役割があることを示唆している。

3) 変異体47の表現型の原因変異の同定

次に変異体47の原因遺伝子の特定を試みた。染色体腕末端に挿入されたP因子マーカー遺伝子との組換え価検定やSNP解析、染色体欠失系統との相補性検定を行ない、遺伝子座を約100kbpの領域に狭めた。さらに次世代シーケンサーSolid5500x1をもちいて全ゲノム再シーケンシングを行ない、当該領域を解析した結果、原因変異が存在する領域にCG42508遺伝子およびCG4510遺伝子に1つずつミスセンス変異が見つかった。そこで、この2つの遺伝子に関して、各々野生型のcDNAを発現するトランスジェニックハエを作成した。各々のトランスジーンを変異体47に置いて発現させた所、CG42508遺

伝子を発現させた場合にのみ、色素顆粒運動が正常に起こり、表現型がレスキューされた。従って、変異体47の表現型の原因変異はCG42508遺伝子のミスセンス変異であり、CG42508遺伝子が色素顆粒運動に必要であることが分かった。

4. 考察 まとめ

本研究では、光依存的な色素顆粒の移動に関わる因子の単離を目的とし、EMS処理による変異導入とDPPを利用した変異体探索を行なった。この結果得られた変異体の内から正常なERGを示し、色素顆粒の移動に関わる因子の異常である可能性が高い変異体を選別した。その結果得られた3つの変異体のうち、表現型からMyosinVと色素顆粒を繋ぐ因子、もしくは、その連結の調節に関わる因子であることが予測された変異体47については原因遺伝子の同定を行なった。

1) 変異体8はMyosinVの発現異常変異体と考えられる。

変異体探索の結果得られた変異体のうち、変異体8は、MyosinV変異体と相補性を示さず、また抗MyosinV抗体を用いたウエスタンブロット法と抗体染色の結果からMyosinVの発現量が著しく減少していることが分かった。このことは変異体8がMyosinVの欠損変異体である可能性を強く示唆している。このように光依存的な色素顆粒の移動に関わる因子が既に示されている因子の変異体得られたことから、本研究における変異体探索方法は有効であり、機能しており、光依存的な色素顆粒の移動に関わるさらなる因子の単離を行なうためには妥当な方法であると考えられた。

2) CG42508はMyosinVと色素顆粒の結合を制御する。

本研究で行なった変異体探索において得られた変異体47は、光を照射し続けてもDPPの光量変化が起こらなかったことや、ERGを測定した結果 正常な光応答がみられたことから、色素顆粒の移動に関わる因子の異常と考えられた。そこで、電子顕微鏡を用いて変異体47視細胞内の色素顆粒の局在を詳細に調べた結果、変異体47では色素顆粒は感桿分体直下にはほとんど観察されず、野生型暗所での局在部位に留まっていた。このことから、変異体47視細胞では色素顆粒が全く輸送されないと考えられた。次に、間接蛍光抗体法により色素顆粒の移動に必要なMyosinVの局在を観察した結果、変異体47においても野生型と同様に、MyosinVは感桿分体の直下に観察された。このことから、変異体47においてMyosinVは正常に移動することが示唆された。このように変異体47において色素顆粒とMyosinVの脱共役が観察されたことは、変異体47において欠損している因子が、MyosinVと色素顆粒を繋ぐ因子、もしくは、そのような因子の機能調節に関わる因子であることを示唆している。

次に、変異体47の原因遺伝子の特定を試みた結果、CG4510遺伝子とCG42508遺伝子にミスセンス変異が存在することが分かった。さらに、変異体47にCG42508遺伝子を発現させることで、表現型がレスキューされることから、変異体47の表現型の原因変異はCG42508遺伝子のミスセンス変異であり、CG42508遺伝子が色素顆粒運動に必要であることが分かった。

今後は、CG42508遺伝子の産物が、変異体47の表現型の解析から考えられたように、MyosinVと色素顆粒を繋ぐ因子、もしくは、そのような因子の機能調節に関わる因子であるのかどうかを、抗体染色や生化学的アッセイなどを含む様々な方法で解析していきたいと考えている。

5. 発表論文、参考文献

1. Satoh, A. K., Li, B., Hongai Xia and Ready D. F. (2008) Calcium-activated Myosin V closes the *Drosophila* pupil. *Current Biology*. 18, 951-955.

2. Li, B.*, Satoh, A. K.* and Ready D. F. (*: contribute equally) Myosin-V, Rab11 and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors *J. Cell Biol.* 177, 659-69.

3. Franchestini N: Information Processing in the Visual Systems of Arthropods: 2 Pupil and Pseudopupil in the Compound Eye of *Drosophila*. R. Wehner, ed. Berlin, Springer: pp. 7582, 1972