

基底膜の動態と局在を制御する遺伝子の同定と分子機構の解明

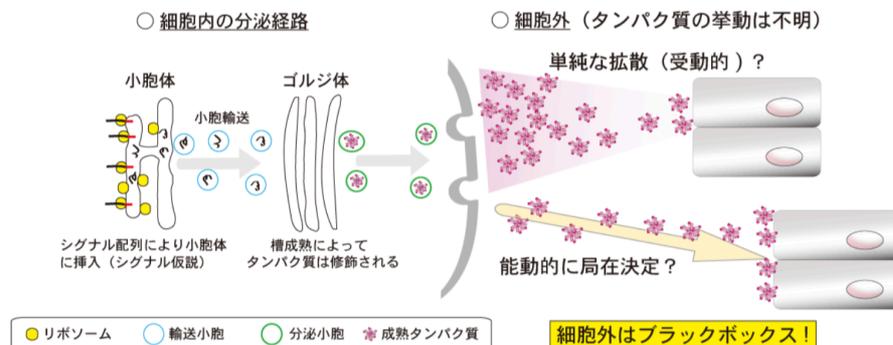
国立高等専門学校機構 有明工業高等専門学校 創造工学科

伊原 伸治

1. はじめに

緒言

細胞内から細胞外へのタンパク質の分泌経路の始点は、タンパク質合成である。タンパク質の合成はリボソームで始まり、シグナル配列によって小胞体へ送り込まれる（図1）。次に小胞体で適切にフォールディングされ、小胞輸送によりゴルジ体へ運ばれ、さらに分泌小胞によって細胞外へ分泌される。これまでにタンパク質合成から細胞膜への輸送経路の概略は明らかになってきたが、細胞外に分泌後、細胞間隙での細胞外タンパク質の挙動は殆どわかっておらず、その分子機構はブラックボックスである。支配的な考え方は、図1に示すような単純な拡散によって近い組織にはより多く局在するが、遠方の組織では局在量が少ない、といった受動的な要因によってその局在量が決定されるといった考え方である。私は、細胞外へ分泌されたタンパク質は受動的な拡散ではなく、能動的にその組織局在が決定されるのではないかと仮説をたて、細胞外へ分泌後に必ず決まった組織に局在する基底膜タンパク質、IV型コラーゲンに着目して、IV型コラーゲンの組織への局在パターンに異常を示す変異体を樹立した。申請課題ではこの変異体を解析することで、細胞外タンパク質であるIV型コラーゲンの組織パターンを決定する分子機構の解明を行う。またさらに変異体のスクリーニングを行い、基底膜タンパク質の組織パターンに異常を示す新規な変異体の獲得を行い、その分子基盤の解明を目指した。



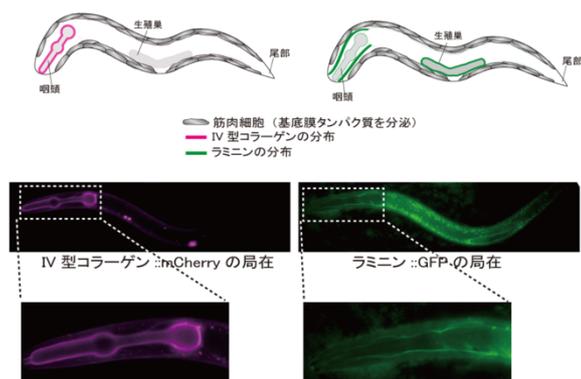
(図1) 細胞内から細胞外への分泌経路の概略図

1. 目的

申請課題では、2つのテーマに焦点を絞って解析を行った。

(1) IV型コラーゲンの組織への局在パターンに異常を示す変異体の解析

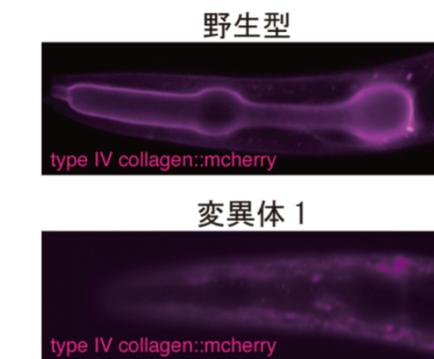
基底膜は進化的に保存された複数のタンパク質から構成されている。基底膜を構成するタンパク質は全て分泌タンパク質から構成される。基底膜構成タンパク質の特性として、発生の時期や組織に依存した発現パターン



(図2) 基底膜分布の模式図 (上段) と実際の生体内での基底膜の局在

の変動が知られている。例えば線虫では、同じ細胞からIV型コラーゲンとSPARC(どちらも基底膜を構成する分泌タンパク質)が細胞外へ分泌されていても、2つの基底膜タンパク質は異なる組織の基底膜へ局在する事がこれまでに報告されている。またラミニンも基底膜の主要構成タンパク質であるが、線虫の体内では、IV型コラーゲンと異なり、生殖巣の基底膜に強く局在する(図2)。異なるプロモーターで発現させても、同様の局在パターンを示し、この観察結果は、細胞外に放出されたタンパク質は組織への運搬を決定する分子基盤が存在する事を示唆している。

これまでに、IV型コラーゲンの咽頭基底膜への非常に強い局在を指標にして、咽頭基底膜へ局在しなくなる変異体を樹立している(図3)。その変異体を解析することで、細胞外で規定膜タンパク質の局在決定機構を明らかにする。



(図3) 基底膜の分布に異常を示す変異体

(2) 分泌タンパク質の局在パターンに異常を示す新規変異体の樹立

可視化されたIV型コラーゲンの咽頭基底膜の局在を指標にして、分泌タンパク質の局在に異常を示す新規変異体を樹立する。

2. 方法

研究課題(1) IV型コラーゲンの組織への局在パターンに異常を示す変異体の解析では、野生型と比較して変異体の咽頭基底膜では、どの程度までIV型コラーゲンの局在が低下するのか、蛍光輝度を解析する。また変異体の責任遺伝子を同定するためにSNPマッピングを行う。

研究課題(2) 分泌タンパク質の局在パターンに異常を示す新規変異体の樹立では、極めて有効な変異原である化学的突然変異誘起剤(EMS)を用いて、穴のサイズに破綻を示す変異体を確立する。EMSによる方法では、機能欠損変異体のみならず、機能亢進(hypermorph)、機能低下(hypomorph)などの変異体獲得が期待できるためである。

3. 結果

(1) IV型コラーゲンの組織への局在パターンに異常を示す変異体の解析

これまでに、線虫*C. elegans*を用いてIV型コラーゲンが正常に局在しない変異体を樹立した。その表現型を図3で示す。通常、野生型では、IV型コラーゲンは、咽頭組織に沿って強く局在を示す。しかしながら、下段の変異体では、その局在が低下している。この変異体をAbnormal Emb-9 Localization-1(*ael-1*)、以下*ael-1*変異体と定義した(図3)。

○ 表現型の解析

次に*ael-1*変異体で、IV型コラーゲンの局在の定量化を試みた。IV型コラーゲンは赤色蛍光タンパク質であるmcherryで可視化しており、同一の発現ラインを用いることで定量化を行った。定量方法は野生型と変異体の基底膜の蛍光分布を撮影後、Image-Jを用いてその蛍光輝度を定量した。その結果を図4に示す。野生型と比較して*ael-1*変異体では、蛍光輝度が1/4程度まで低下しており、IV型コラーゲンの局在量が低下していることが明らかになった(図4)。

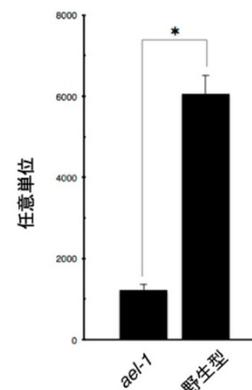


図4 WTと *ael-1*変異体の蛍光輝度値

○ 遺伝子マッピング

*ael-1*変異体の責任遺伝子を同定するためにSNPを用いた遺伝子マッピングを行った。*ael-1*変異体は、イギリス由来のN2株(標準株)から樹立している。SNPマッピングのための掛け合わせはハワイ産のCB4856株を用いた。CB4856株は、標準株であるN2株に比べて約1000bpに一つの割合でSNPを持っていることが知られている。このCB4856株を*ael-1*変異体とかけ合わせることにより、各染色体の左端、中央、右端においてSNPのチェックを行った。SNPマッピングの結果、*ael-1*変異体の責任遺伝子は3番染色体の右端に存在することが明らかになった。

(1) 分泌タンパク質の局在パターンに異常を示す新規変異体の樹立

当初、*ael-1*変異体と同様の表現型の変異体の樹立を目指して、化学的突然変異誘起剤(EMS)で処理後に数千ハプロイドの線虫を観察したが目的の表現型を示す変異体は樹立できなかった。しかしながら、分泌型GFPが基底膜に特異的に局在する*xyz16*変異体を樹立す

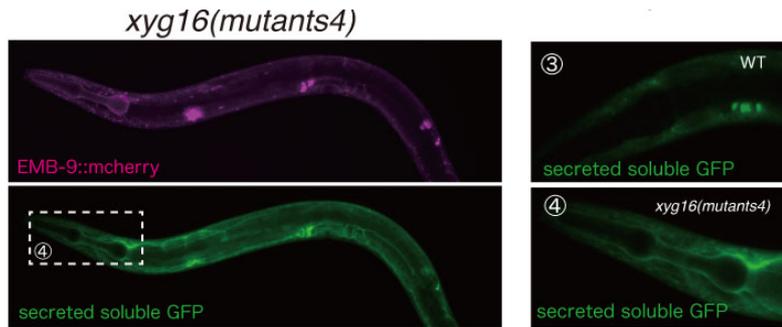


図5 *xyz16*(mutants4) では、分泌型 GFP(secreted soluble GFP) が基底膜へ局在する

ることができた(図5)。*xyz16*変異体は、野生型では分泌型GFPは基底膜に全く局在しないが、(図5③)、*xyz16*変異体では、分泌型GFPが基底膜に強く局在するようになる(図5④)。また規定膜タンパク質であるIV型コラーゲンの局在は正常であることも明らかになった。

4. 考察

IV型コラーゲンを可視化したストレインを用いた蛍光輝度の測定により、*ael-1*変異体では、基底膜へのコラーゲンの局在が1/4程度まで低下することが明らかになった。また遺伝子マッピングを行った結果、責任遺伝子は3番染色体に存在することが明らかになった。今後の予定として、次世代シーケンサーの解析によって、変異遺伝子の決定を行う。変異遺伝子同定後は、発現細胞の確認、組織特異的に発現させるレスキュー実験を行い、IV型コラーゲンの局在決定機構を明らかにする。また分泌型GFPが局在する*xyz16*変異体もSNPマッピングを行い、その責任遺伝子の同定を行う予定である。

5. 発表論文、参考文献

- (1) Optical and genetic analyses of basement membrane deposits in *C. elegans*. Kanae Matsuo and Shinji Ihara 線虫研究の未来を創る会 2018年9月14日
- (2) 基底膜タンパク質の局在決定機構の遺伝学的解析 松尾佳苗、伊原伸治 平成30年度日本生化学九州支部例会 2018年6月30日