

ショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングによるシナプス局在蛋白質の網羅的同定

●星野 幹雄 ◆曾根 雅紀

京都大学医学研究科

〈研究の目的と進め方〉

シナプスに関わる諸問題の抜本的解決のためには、シナプス局在蛋白質の網羅的同定と解析が不可欠である。本研究では、ゲノム上においてシナプス局在蛋白質をスクリーニングするための新しい方法として、ショウジョウバエの遺伝学を用いる。具体的には、シナプスに局在し、欠損変異体で行動異常を引き起こすHIG蛋白質を利用する。シグナル配列を持ち膜貫通ドメインを持たない分泌蛋白質であるHIG蛋白質は、蛹期のシナプス形成過程において、シナプス形成の初期段階である蛹中期においてはシナプスに輸送されシナプスに局在するが、その後の蛹後期においては細胞体にのみ局在することになることから、シナプスへの軸索小胞輸送を介した局在機構が発生段階によって特殊な制御を受けていることが予想されていた。そこでまず、HIGのシナプスへの輸送の制御機構を詳細に解析し、その輸送に関わるシグナルもしくはドメインを同定し、シナプスへの輸送能を失った改変HIG蛋白質を作成することを目指した。さらに、この改変HIG蛋白質をコードする遺伝子をエクソントラップベクターに組み込んで、ゲノム状の様々な位置に挿入した個体を大量に作成することによって、ある確率でエクソントラップベクターがゲノム状の未知のシナプス局在蛋白質をトラップし、改変HIGとその新規シナプス局在分子との融合蛋白質が産生されるのではないかと予想した。さらに、このかけ合わせを、行動異常を引き起こし成虫のハエがほとんど動かないhig変異体のバックグラウンドにおいて行うことによって、行動異常のレスキューを指標にし、具体的には動かないハエの中からよく動くようになったハエをスクリーニングすることによって、シナプス局在分子をスクリーニングできるのではないかと考えた。この方法の利点は、雑種第一代でスクリーニングを行うことができるため、大量の個体をスクリーニングできるという点、および、たった一匹とれてきたレスキュー個体からかけ合わせによって子孫を得て系統化することができるという点である。hig変異体はシビアな行動異常を起こし生殖能力がないが、hig変異体にhig遺伝子のミニジーンを外来性に導入して発現させることによって、その行動異常は野生型レベルまでほぼ完全にレスキューし、生殖能力も回復するということがすでにわかっていた。

〈研究開始時の研究計画〉

まず、外来性に導入したHIG蛋白質の局在を、蛹期の各発生ステージの脳においてエピトープタグに対する抗体を用いて検出する系を作り、それを用いてHIG蛋白質の各ドメイン構造を欠失させた蛋白質の局在を調べていくことによって、HIG蛋白質の局在に関わるシグナルもしくはドメインを同定する。また、各欠失蛋白質のhig変異体行動異常表現型のレスキュー能を調べることによって、HIG蛋白質の分子機能にどのドメインが関わっているのかを明らかにする。以上の研究結果に基づいて、シナプスへの輸送能を失い、かつ分子機能を保持している

ような、改変HIG蛋白質をコードする遺伝子を作成し、それをエクソントラップベクターに組み込み、これを持つ形質転換ショウジョウバエを作成する。予備実験として、作成したベクターが確かにエクソントラップのイベントを起こしうることを、および用いている改変HIG蛋白質が既知のシナプス分子との融合蛋白質として発現した時にhig変異の行動異常表現型のレスキュー能を持つこと、の2点を確認する。さらに、スクリーニングのパイロット実験を行い、スクリーニングの頻度を検定するとともに、スクリーニング法を種々の工夫で最適化することによって、頻度を高めることを目指す。その上で、実際のスクリーニングに着手する。

〈研究期間の成果〉

内在性のHIG蛋白質を抗HIG抗体を用いて検出すると、成虫の神経回路のシナプス形成の初期段階である蛹中期においてはHIGはシナプスに輸送されシナプスに局在するが、その後の蛹後期においては細胞体にのみ局在しシナプスに局在しなくなることが本研究開始以前にわかっていた。ショウジョウバエの脳においては、脳の表層部のcortexに神経細胞の細胞体があり、中心部のneuropilにおいてシナプスが形成される。したがって、切片状では神経細胞の細胞体とシナプスが、明らかに分離した場所(cortexとneuropil)に位置しているため、光学顕微鏡レベルで容易に特定の蛋白質の神経細胞内局在をin vivoで調べることができる。まず、HIG蛋白質をHAタグとの融合蛋白質として、形質転換ショウジョウバエを用いて外来性に、ヒートショックプロモーターを用いて任意の時期(蛹中期および蛹後期)に発現させ、その局在を抗HA抗体を用いた免疫染色によって調べたところ、内在性HIGの局在をミミックし、蛹中期にはシナプスに輸送されたが蛹後期には細胞体にのみ局在した。また、HAタグの代わりにFLAGタグを用いても、同様の結果が得られた。

次に、この系を用いて、種々のドメインを欠く一連のHIG欠失コンストラクトを作成し、それらの形質転換ショウジョウバエを用いて欠失蛋白質の局在を調べることによって、HIGの局在に関わるシグナルもしくはドメインを同定した。HIGは、N末端にシグナル配列を持ち、N末端側半分の部分にRDGモチーフを持ち、C末端側半分の部分に5つの補体結合ドメインと1つの免疫グロブリンドメインを持つ。ドメイン解析の結果から、最も重要な結果としては、第一補体結合ドメインを欠く欠失HIG蛋白質(DCB1 HIG)が、蛹中期にも蛹後期にもシナプスに輸送されなくなることがわかった。さらに、CB1ドメインを単独で発現させると、蛹中期にも細胞体にのみ局在したため、このドメインにシナプスへの輸送に必要な十分なシグナルが含まれるわけではないことがわかったが、蛹中期に全長HIGと同時にCB1ドメインを発現させると、全長HIGのシナプスへの輸送に対する阻害効果を示したため、CB1ドメインにシナプスへの輸送に必要なシグナルが含まれていることが示唆された。また、RDG配列、

免疫グロブリンドメイン、第五補体結合ドメインをそれぞれ欠く欠失HIG蛋白質は、蛹後期においても部分的にシナプスに輸送されたため、これらのドメインが蛹後期におけるHIG蛋白質のシナプスへの輸送阻害に関与している可能性が示唆された。

次にそれぞれの欠失HIG蛋白質の、hig変異行動異常表現型のレスキュー能を調べた。hig変異体は成虫において顕著な行動異常を示し、ハエがほとんど動かなくなるが、外来性のhigを蛹中期において一過性に発現させると成虫の行動異常がほぼ完全にレスキューされるということが、本研究開始以前にわかっていた。また、外来性のhigを蛹後期に発現させても、おそらくシナプスに輸送されないためであると思われるが、レスキュー能を示さない。本研究において一連の欠失HIG蛋白質の、蛹期の各ステージで一過性に発現したときの、成虫の行動異常のレスキュー能を調べた。まず、シナプスに輸送されないDCB1 HIGは、蛹中期に発現させても全くレスキュー能を示さなかった。これは、HIGの機能部位がシナプスであり、DCB1 HIGがシナプスに輸送されないためであると思われる。しかしながら、CB1ドメイン以下の多くのドメインを欠く、N末端側半分のみ欠失HIGを発現させたところ、予想外の結果ではあったが、蛹中期においてシナプスに輸送され、レスキュー能を示した。逆に、N末端側半分を欠いた欠失HIGは全くレスキュー能を示さなかった。以上の結果から、HIG蛋白質のN末端側半分の部分がHIG蛋白質の分子機能に非常に重要であり、この部分だけで行動異常のレスキュー能を発揮するために十分であろうということが示唆された。さらに、DCB1 HIGは、シナプスに輸送されないためにレスキュー能を有していないが、N末端側半分の部分はintactに持っているため、HIGの（少なくとも行動異常のレスキューに必要な）分子機能は保持しているだろう、すなわち、これを強制的にシナプスに輸送されることができれば、レスキュー能を示すのではないかとということが予想され、これを、当初の目的の、エクソントラップベクターに組み込むための改変HIGとして使えるであろうということが予想された。すなわち、研究開始当初には、スクリーニング型を開発するための技術的課題として、シナプスへの輸送ドメインとレスキュー能がカップルしているのではないかと懸念されていたが、ドメイン解析の結果から、局在シグナルとレスキュー能を明確に分離することができた。

次に、スクリーニングのシステムが機能するかどうかを確かめるためのいくつかの予備実験を行った。まず、全長HIGとGFPとの融合蛋白質を作成したところ、これは本来と同様の局在を示し、さらに行動異常のレスキュー能も示した。このことから、HIGは、他の蛋白質と融合蛋白質を作った状態でもレスキュー能を保持するということがわかった。

スプライシングのアクセプターサイトのみを持つ第一バージョンのエクソントラップベクターを作成し、その形質転換ショウジョウバエを作った。その形質転換システムの中から、トランスポゾン転移効率の検定を行い、高い頻度で転移の起こるシステムを選別し、スターターシステムとして使うことにした。これを用いて、スクリーニングの小規模なパイロット実験を行った。その結果、行動異常のレスキューシステムが2系統、また、スクリーニングの副産物として、hig変異のエンハンサーシステムが1系統得られた。レスキューシステムのベクター挿入部位を調べた結果、1つはシグナル配列を持つ分泌蛋白質をコードする遺伝子の近傍に挿入していて、データベース上で予測されているイ

ントロン中には挿入していなかった。もう1つは、転写因子をコードするshunurri遺伝子のイントロン中に挿入していた。この挿入システムに関してRT-PCR実験を行った結果、エクソントラップのイベントが確かに起きていることが確認されたが、このイントロンは蛋白質をコードしない領域に位置していた。したがって、両者とも、エクソントラップレスキューが成功している証拠はなく、むしろ、higのサプレッサー変異である可能性が高いと思われる。しかしながら、以上の結果より、スクリーニングベクターが確かに一定の確率でイントロンに挿入すること、および、イントロンに挿入した場合にはおそらくreliableにエクソントラップのイベントが起きるのであるであろうということが確認されたので、このシステムで大規模にスクリーニングを行っていけば、ある頻度で未知のシナプス分子をトラップできるであろうということが予想された。

平行して、DCB1 HIGと既知シナプス分子との融合蛋白質を発現させたときに、確かにレスキュー能を示すということを確認するための実験を行った。データベース上でシナプスに局在することが知られているショウジョウバエの既知の分泌蛋白質または膜蛋白質を検索したが、なかなか入手可能な良い分子を見出すことができなかった。まずは、アセチルコリンエステラーゼ遺伝子とDCB1 HIG、およびHAタグの融合分子を蛹期の脳で発現させたが、融合蛋白質の発現を抗HA抗体による免疫染色で全く検出することができなかった。次に、シナプスに輸送される膜蛋白質であるAPPLとDCB1 HIG、HAタグとの融合分子を蛹期の脳で発現させたところ、少なくとも部分的にはneuropilに輸送されているのが確認されたが、この分子はhig変異の行動異常のレスキュー能を示さなかった。これにはいくつかの原因が考えられる。まず、実はDCB1 HIGが何らかの理由でレスキューに必要な分子機能を保持していないという可能性がある。また、本来分泌蛋白質であるHIGが膜に結合した状態では機能できない可能性、HIGはsubsetのシナプスのシナプス間隙に分泌されるということがわかっているが、発現させた蛋白質がシナプスには到達しているがシナプス間隙に分泌されていない可能性、また、HIGとAPPLのneuropil内における微細な局在が異なっている可能性、などが考えられる。現在は、APPL-DCB1 HIGの挙動を知るために、プロテアーゼによる分解の状態、またシナプス微細形態における局在を調べるとともに、HIGとAPPLのneuropil内における局在がオーバーラップするかどうかを共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べようとしている。さらに、HIGが細胞膜に結合した状態でレスキュー能を持ちうるのかどうかを調べるとともに、ほかの様々な分子とDCB1 HIGの融合蛋白質でレスキュー能を確かめていこうとしている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ショウジョウバエにおいては、GFPなどを用いたエクソントラップスクリーニングが国内外から報告されているが、シナプス局在分子を多数同定するには至っていない。また、最近、線虫において、RNAi法を用いた、シナプスの機能異常を指標にしたゲノム規模のスクリーニングの結果が報告されているが、このスクリーニングによって、これまでに知られていなかったシナプス機能に関わる分子が多数同定された。この結果は、シナプス分子を網羅的に同定していくアプローチが、脳神経研究の重要なブレイクスルーを作り出しうることを示している。しかしながら、このスクリーニングでは、loss-of-functionの表現型を指標にしているために、脳システムの一般的

特性である冗長性が働いた結果として顕著な表現型を示さない分子がスクリーニングから漏れてしまう。行動異常のレスキュー実験とエクソントラップ実験を組み合わせることは、おそらく本研究独自であり、シナプスへの局在を指標にした大規模スクリーニング法の開発に向けて、さらに研究を進めようとしているところである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本研究の開始当初には、HIG蛋白質の局在シグナルとレスキュー活性を分離できるかどうか、ベクターが高い確率でイントロンに挿入するかどうか、また、reliableにエクソントラップのイベントが起きるかどうか、などの技術的課題があったが、現在のところは、これらの問題点はクリアーされてきているものと思われる。さらに、DCB1 HIGと既知シナプス分子との融合蛋白質でレスキュー活性を確認するという、最後のハードルを越えるのに時間を要している。

〈今後の課題〉

実際のエクソントラップレスキューの確実な成功例を得ることが当面の目標である。そのためには、理論上も、(ベクターがイントロンに挿入する確率、フレームおよび転写の向きが合う確率、分泌蛋白質または膜蛋白質をトラップする確率、それがシナプスに局在する確率、位相的に細胞外の部分のイントロンにベクターが挿入する確率を考えると) ある程度の規模でスクリーニングを行う必要がある。スクリーニング自体は非常に簡便であるのがこの方法の利点であるため、まずは、上述したように、既知シナプス分子との融合蛋白質でレスキュー活性を確認するという最後のハードルを越えた上で、大規模なスクリーニングを行っていくことは現実的に可能であると思われる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1 Masaki Sone, Emiko Suzuki, Mikio Hoshino, Dongmei Hou, Hiroshi Kuromi, Masaki Fukata, Shinya Kuroda, Kozo Kaibuchi, Yo-ichi Nabeshima and Chihiro Hama, Synaptic development is controlled in the periaxonal zones of *Drosophila* synapses. *Development*, 127, 4157-4168 (2000).
- 2 Masato Yoshizawa, Mikio Hoshino, Masaki Sone and Yo-ichi Nabeshima, Expression of stef, an activator of Rac1, correlates with the stages of neuronal morphological development in the mouse brain. *Mech. Dev.*, 113, 65-68 (2002).
- 3 Naoki Matsuo, Mikio Hoshino, Masato Yoshizawa, and Yo-ichi Nabeshima, Characterization of STEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, required for neurite growth. *J. Biol. Chem.* 277, 2860-2868 (2002)
- 4 Masato Yoshizawa, Masaki Sone, Naoki Matsuo, Takahiro Nagase, Osamu Ohara, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino, Dynamic and coordinated expression profiles of Dbl-family guanine nucleotide exchange factors in the developing mouse brain. *Gene Expression Patterns*, 3, 375-381 (2003)
- 5 Naoki Matsuo, Mami Terao, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino, Roles of STEF/Tiam1, guanine nucleotide exchange

- factors for Rac1, in regulation of growth cone morphology. *Mol. Cell. Neurosci.*, 24, 69-81 (2003)
- 6 Takeshi Kawauchi, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino, The in vivo roles of STEF/Tiam1, Rac1 and JNK in cortical neuronal migration. *EMBO Journal*, 22, 4190-4201 (2003)
 - 7 Mari Dezawa, Hiroshi Kanno, Mikio Hoshino, Hiroto Cho, Naoya Matsumoto, Yutaka Itokazu, Nobuyoshi Tajima, Hitoshi Yamada, Hajime Sawada, Hiroto Ishikawa, Toshirou Mimura, Masaaki Kitada, Yoshihisa Suzuki & Chizuka Ide, Specific induction of neuronal cells from bone-marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J. Clin. Invest.*, 113, 1701-1710 (2004)
 - 8 Takashi Nishimura, Tomoya Yamaguchi, Katsuhiko Kato, Masato Yoshizawa, Yo-ichi Nabeshima, Shigeo Ohno, Mikio Hoshino, and Kozo Kaibuchi, PAR-6-PAR-3 mediates Cdc42 signaling to Rac activation through STEF/Tiam1, RacGEFs. *Nature Cell Biol.* 7, 270-277 (2005)
 - 9 Masato Yoshizawa, Takeshi Kawauchi, Masaki Sone, Yoshiaki V. Nishimura, Mami Terao, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima and Mikio Hoshino, Involvement of a Rac activator, P-Rex1, in neurotrophin-derived signaling and neuronal migration. *J. Neurosci.* 25, 4406-4419 (2005)
 - 10 Takeshi Kawauchi, Kaori Chihama, Yoshiaki V. Nishimura, Yo-ichi Nabeshima, and Mikio Hoshino, MAP1B phosphorylation is differentially regulated by Cdk5/p35, Cdk5/p25 and JNK. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 331, 50-55 (2005)
 - 11 Mari Dezawa, Hiroto Ishikawa, Yutaka Itokazu, Tomoyuki Yoshihara, Mikio Hoshino, Shin-ichi Takeda, Chizuka Ide & Yo-ichi Nabeshima, Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*, 309, 314-317 (2005)
 - 12 Mikio Hoshino, Shoko Nakamura, Kiyoshi Mori, Takeshi Kawauchi, Mami Terao, Yoshiaki V. Nishimura, Akihisa Fukuda, Toshimitsu Fuse, Naoki Matsuo, Masaki Sone, Masahiko Watanabe, Haruhiko Bito, Toshio Terashima, Christopher V.E. Wright, Yoshiya Kawaguchi, Kazuwa Nakao, Yo-ichi Nabeshima, Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron*, 47, 201-213 (2005)
 - 13 Takeshi Kawauchi, Kaori Chihama, Yo-ichi Nabeshima, Mikio Hoshino, Cdk5 phosphorylates and stabilizes p27kip1, contributing to actin organization and cortical neuronal migration. *Nature Cell Biol.* 8, 17-26 (2006)