

ショウジョウバエ視細胞の頂端面膜内ドメイン分化における  
シンダピン遺伝子の役割

**Syndapin contributes to apical membrane subdivision  
in *Drosophila* photoreceptors**

(動物学会推薦)

代表研究者 広島大学 佐藤 明子 Hiroshima University Akiko Kono Satoh

*Drosophila* photoreceptors develop from polarized epithelial cells that have apical and basolateral membranes with distinct functions. During morphogenesis, the apical membranes subdivide into a united bundle of photosensory microvilli (rhabdomeres) and a surrounding supporting membrane (stalk). In the present study, (1) F-Bin/Amphiphysin/Rvs (F-BAR) protein syndapin in concert with moesin constricted the neck of the microvilli and organized catacomb-like membrane architecture at the base of the rhabdomeres to exclude the stalk membrane from the united bundle of the microvilli, resulting in apical membrane segregation and (2) simultaneous loss of syndapin with a microvilli adhesion molecule chaoptin significantly enhanced the disruption of stalk-rhabdomere segregation, resulting in microvilli spreading across the apical membrane. The results indicate that the apical membrane segregation is powered by two independent microvilli bundling activities: (1) microvillus self-adhesion through the entire length of microvilli mediated by chaoptin and (2) catacomb-like structure organization at the neck and base of microvilli mediated by syndapin and moesin.

**研究目的**

我々の体を形作る細胞の多くは極性を持っており、その極性構造を形成・維持することがその機能に重要である。そのため、細胞や組織の持つ、頂底極性、平面内極性（水平極性）などの分子機構の解明は、細胞生物学の重要課題と考えられ、よく研究されている。一般的な上皮細胞は頂端面膜と側底面膜という2つの膜区画を持つが、ショウジョウバエ視細胞は4つの異なる膜ドメインを持つ。ショウジョウバエ視細胞は上皮細胞から分化するが、この発生過程で側底面より軸索が伸長し、また頂端面が光受容膜とその周辺のストーク膜とに分化する。この頂端面膜の分化過程は、英語では”apical membrane subdivision”、日本語では“頂端面膜内ドメイン分化”と呼ぶ事としたい (Fig. 1)。この頂端面膜内ドメイン分化には Crb と Moe が必須と報告されている

が (Pellikka et al., 2002; Karagiosis and Ready, 2004)、その分子機構はよく分かっていない。このような頂端面膜内部ドメインの分化過程の研究はまだ殆ど行われていないが、脊椎動物においても頂端面膜の一部が特化した役割を持つことは幾つかの細胞種で観察されている。例えば、視細胞・聴覚細胞共に頂端面膜の一部が感覚受容膜として分化している。上皮細胞においても、微絨毛膜は必ずしも均

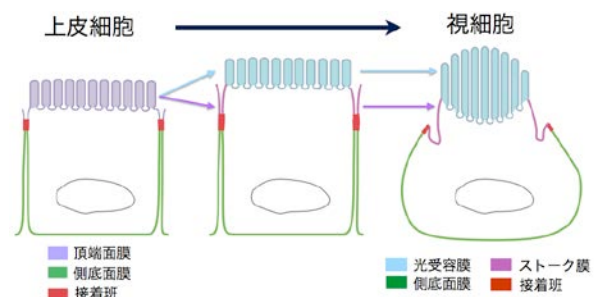


Fig.1 apical membrane subdivision of fly photoreceptors.

一に頂端面膜から生じているわけではなく、ショウジョウバエ視細胞と同様の頂端面膜内部ドメイン分化の機構を保持している可能性がある。

我々の研究グループでは、ショウジョウバエ視細胞における光受容膜の形成機構を研究している。光受容膜は約 50nm の太さの微絨毛が束になったものであり、頂端面膜の中央部分に 1 塊となって形成される。光受容膜形成に関わる因子を同定するために、EMS で処理して DNA に傷をつけた変異体集団について、光受容膜の構造を観察することで光受容膜の形成が欠損している変異体をスクリーニングし、光受容膜の形成過程に欠損が見られる多数の変異体を単離した。その内の 1 つ 661T 変異体では、光受容膜とストーク膜が明確に分離していなかった (Fig. 2)。頂端面膜には、少しずつ束になった微絨毛が散在し、間には切れ切れになったストーク膜が介在しており、光受容膜とストーク膜が 1 つにまとまることなく頂端面膜上に広がっていた。つまり、apical membrane subdivision が特異的に欠損していると考えられた。

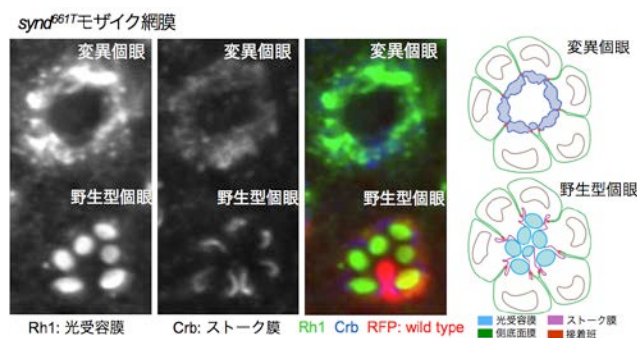


Fig.2 661T mutant phenotype.

そこで、この 661T 変異体における apical membrane subdivision 欠損の原因となる変異を同定するために、次世代シーケンサーを用いた変異同定と原因変異の位置をマッピングした結果、Syndapin 遺伝子 (Synd) のノンセンス変異が原因と考えられた。本研究では、Synd の機能解析を行い、apical membrane subdivision がの分子機構の解明を行った。

## 研究経過

1) 661T 変異体における apical membrane subdivision 欠損の原因が、Synd の欠損であることを証明した。

まず、Synd の別の欠損変異アリルと 661T 変異との相補性テストを行った。その結果、Synd 欠損変異アリルは、661T 変異を相補しなかった。さらに、野生型 Synd を 661T 変異で発現させた結果、apical

membrane subdivision が正常に起こり、661T 変異表現型が完全にレスキューされた。この 2 つの実験から、661T 変異体における apical membrane subdivision 欠損の原因が、Synd の欠損であることを証明できた。

2) Synd は光受容膜基部の括れ構造に局在する。

Synd に対する抗体を作成し、間接蛍光抗体法によりその局在を解析した所、野生型視細胞では、Synd が光受容膜の基部に局在することが明らかとなった。以前の研究により、apical membrane subdivision に必要な Moe の活性型フォーム、リン酸化 Moe (p-Moe) が光受容膜基部に局在する事が示されている (Karagiosis and Ready, 2004)。そこで Synd と p-Moe の 2 重染色網膜を共焦点レーザー顕微鏡により解析した結果、両者が光受容膜の基部において共局在することが分かった。さらに 2 つのタンパク質の局在をより詳細に観察するために、2D-STORM を用いて観察を行った。その結果、Synd が約 50nm 間隔の 6 方格子を形成するドットとして局在すること、p-Moe は、Synd のドット染色の間に位置することを見出した。ショウジョウバエ視細胞の光受容膜は、約 50nm の太さの微絨毛膜が互いに接着し束であり、光受容膜基部の細胞膜のシート面からは、微絨毛膜が約 50nm 間隔の 6 方格子状のドット状に生えている。2D-STORM により観察された約 50nm 間隔の 6 方格子状のドット状の Synd 局在は、この微絨毛膜が膜シートから生える場所に位置していると考えられた。Synd は膜を曲げる活性を持つ F-BAR ドメインを N 末端側にもっている。生化学的実験によりショウジョウバエ Synd は膜チューブルを形成する機能を持つことが示されている (Edelinf et al., 2009; Shimada et al., 2007; Wang et al., 2009)。微絨毛膜は光受容膜基部の細胞膜のシート面で括れているが、この括れの曲率は、結晶構造から示された Synd タンパク質の曲率と一致している (Edelinf et al., 2009)。これらの知見と我々の 2D-STORM の結果は、Synd が微絨毛膜の基部に結合し、括れ構造を形成することを示唆している。

3) Synd と Moe 変異体では、微絨毛の基部の括れ構造が欠損している。

Synd もしくは Moe 変異体では、apical membrane subdivision が欠損しているが、微絨毛自身は形成されており、頂端面全体から伸びている。そこで、Synd もしくは Moe 変異体の微絨毛基部を電子顕微鏡

を用いて詳細に観察した。その結果、Synd と Moe 変異体では、微絨毛の基部の括れ構造が欠損しており、微絨毛膜が頂端面の膜シートから括れを形成することなく直接伸びていることを見出した。従って、Synd と Moe は微絨毛基部において、括れの形成に関与していることがわかった。この結果は、この括れの形成が apical membrane subdivision に関わることを示唆している。光受容膜基部の細胞膜のシート面と微絨毛基部の括れの一連の構造は、カタコンベ様構造と呼ばれ、曲率の高い独特の膜構造を形成している。Synd と Moe 変異体では、微絨毛基部における括れ構造の欠損に伴い、カタコンベ様構造が形成されていない。従って、このカタコンベ様構造の自己形成力が apical membrane subdivision の分子機構そのものと考えられる。

#### 4) Synd の光受容膜基部へのリクルートに Moe は必要なく、Moe の光受容膜基部へのリクルートに Synd は必要ない。

Synd と Moe はいずれも光受容膜基部に局在し、Synd と Moe 変異体では、いずれもカタコンベ構造の形成・apical membrane subdivision が欠損している。Synd と Moe の関係を調べるために、Synd 変異体における p-Moe の局在を検討した所、光受容膜に局在することがわかった。また、Moe 変異体における Synd の局在を検討した所、Synd が光受容膜に局在することがわかった。つまり、Synd の光受容膜基部へのリクルートに Moe は必要なく、Moe の光受容膜基部へのリクルートに Synd は必要ないことがわかった。次に、Synd と Moe の相互作用を生化学的に検出することを試みた。免疫沈降実験、プルダウンアッセイのいずれにおいても、Synd と Moe の相互作用は検出できなかった。これらの結果は、Synd と Moe が独立に光受容膜の基部にリクルートされ機能することを示している。

#### 5) Synd と Moe 二重変異体では apical membrane subdivision の欠損表現型が増強されない。

Synd と Moe の関係をさらに検討するために、Synd と Moe の二重変異体を作成し、その表現型を観察した。その結果、Synd と Moe の二重変異体の表現型が、各々の単独変異の表現型と全く同一であり、表現型の増強がおこらないことがわかった。この結果は、Synd と Moe が apical membrane subdivision を制御する同一過程に関わっていることを示している。

#### 6) Synd と Chp 二重変異体では apical membrane

#### subdivision の欠損が著しく増強される。

Choptin (Chp) は微絨毛を束ねる接着因子である (Reinke et al., 1988)。Chp の欠損変異体で、ストーク膜に局在する膜タンパク質 Crb が光受容膜にも分布することから、Chp が apical membrane subdivision に必要である可能性が報告されていた (Gurudev et al., 2014)。そこで、Chp の表現型を電子顕微鏡により観察した。Chp 欠損変異体では、微絨毛は接着性を失っていたが、その基部にはカタコンベ様構造が形成されていた。また、微絨毛はその基部、つまりカタコンベ様構造において 1 つの塊に束ねられており、頂端面はストーク膜と一塊の光受容膜に別れていた。この観察は、カタコンベ様構造が微絨毛を束としてまとめ上げる役割を持つことを強く示唆している。次に Chp の欠損変異体で、ストーク膜に局在する膜タンパク質 Crb の局在を観察した所、先行研究と一致して Crb がストーク膜だけでなく、光受容膜内部にも分布することがわかった。Chp の apical membrane subdivision への必要性をさらに検討するために、Synd と Chp 二重変異体を作成し観察を行った。その結果、Synd や Moe の単独変異体や二重変異体では、部分的に微絨毛が固まっている様子が観察されるのに対し、Synd と Chp 二重変異体では、微絨毛は 1 本 1 本に分離して頂端面膜に広がっていることが分かった。つまり、Synd と Chp 二重変異体では、apical membrane subdivision の欠損は著しく増強されることがわかった。この遺伝学的解析結果は、Chp が Synd や Moe と異なるメカニズムで apical membrane subdivision を制御することを示している。Chp はホモ結合型の接着分子であり、微絨毛の全体に分布して微絨毛を互いに接着させる役割を持つ。従って、遺伝学的解析結果は、Chp による微絨毛同士の接着が apical membrane subdivision の分子機構の 1 つであることを示している。

#### 考察

本研究は、微絨毛を 1 つにまとめ上げる 2 つの独立した力が、apical membrane subdivision の分子機構そのものであることを示した。1 つ目は、Synd と p-Moe による微絨毛基部におけるカタコンベ様構造の形成による微絨毛の束化である。Synd, p-Moe はいずれも光受容膜基部のカタコンベ様構造に局在していた。超解像顕微鏡による解析により Synd は、微絨毛膜基部の括れ構造、p-Moe は括れ同士をつな

いでいる平坦な膜に局在していることがわかった。Synd, Moe の単独変異、また Synd, Moe の二重変異体もカタコンベ様構造の形成が失われていた。これらの結果より、Synd, Moe がカタコンベ様構造に局在することで膜の曲率制御やアクチン繊維への結合を通じて、カタコンベ様構造の形成に寄与することが示唆された。しかしながら、Synd と Moe が実際どのようにしてカタコンベ様構造を形成しているのか、については、今回の解析からは知見が得られず、今後の研究課題となった。もう1つは、Chp による微絨毛膜全体の接着による微絨毛の束化である。Chp が接着分子であり、微絨毛を接着させている分子であることは古くから知られていた。Chp 単独欠損では、光受容膜とストーク膜は完全に分離しており、形態学的には apical membrane subdivision は正常に起こっているように観察されていたが、近年の研究から、Chp 単独欠損変異では、実はストーク膜タンパク質である Crb が光受容膜内部に入り込んでいる事がわかり、apical membrane subdivision に部分的問題があることが示唆されていた。本研究では、Synd と Chp 二重変異体では、Synd や Chp 単独変異体と比較して apical membrane subdivision の欠損は著しく増強されることがわかった。この結果から、Chp による微絨毛膜全体の接着による微絨毛の束化が apical membrane subdivision の分子機構の1つであり、Synd と Moe によるカタコンベ様構造の形成

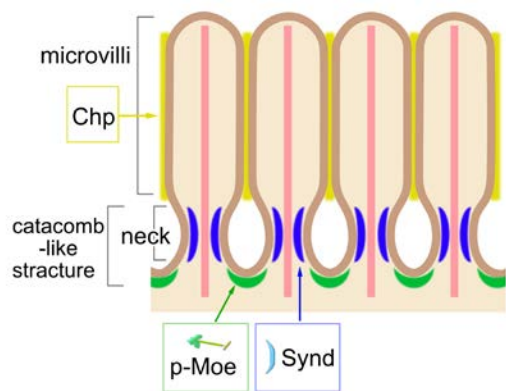


Fig.3 The model of the rhabdomere architecture.

による微絨毛の束化による機構とは独立に機能することが明らかとなった。

本研究によって、微絨毛を1つにまとめ上げる2つの独立した機構、1)カタコンベ様構造の形成によ

る微絨毛基部の束化と2)背着分子 Chp による微絨毛接着による微絨毛膜の束化が apical membrane subdivision を引き起こることが明らかとなった。今後、Synd と Moe 具体的にどのようにしてカタコンベ様構造を形成するのかを明らかにすると共に、脊椎動物の小腸や聴覚細胞など明瞭な微絨毛形成を行う細胞において、微絨毛基部における Synd と Moe の役割を検討していきたい。

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 尾木早紀子、佐藤明子(広島大・院総合科学) Syndapin による subapical differentiation の分子機構解析 中四国生理学シンポジウム 2015年8月11日 (米子)
2. 尾木早紀子、劉自広、佐藤卓至、佐藤明子 頂端面膜ドメイン形成におけるシンダピン遺伝子の機能解析 分子生物学会 2015年12月4日(神戸)-----
3. 佐藤明子、尾木早紀子、松田厚志、劉自広、佐藤卓至 ショウジョウバエ視細胞における頂端面分化の分子機構-電子顕微鏡/超解像顕微鏡観察による Syndpin と Moesin の分子局在モデルの構築 日本比較内分泌学会・日本比較生理生化学会 合同大会 合同シンポジウム “ポストオミックス時代における画像解析の最前線” 招待講演 2015年12月11日(広島)
4. Akiko K. Satoh, Sakiko Ogi, Atsushi Matsuda, Jiguang Li and Takunori Satoh The mechanism of the domain formation within apical membrane in Drosophila photoreceptors -Analysis by electron microscopy and super resolution microscopy, STORM- Gordon Conf. Cell polarity and signaling 2016 June 14 (VT, USA)
5. Sakiko Ogi, Takunori Satoh, Atsushi Matsuda, Jiguang Liu, Akiko K. Satoh The mechanism of the domain formation within apical membrane in Drosophila photoreceptors Japanese Drosophila Research Conf. 2019 Sept 10

### 誌上発表

1. Sakiko Ogi, Atsushi Matsuda, Jiguang Li, Takunori Satoh and Akiko K. Satoh Syndapin contributes to apical membrane subdivision in Drosophila photoreceptors. (in submission)