

基底小体付属構造体の構築を担う分子基盤の解明と その役割の解析

[1] 組織

代表者: 千葉 秀平

(大阪大学大学院医学系研究科)

対応者: 安井 明

菅野 新一郎

(東北大学加齢医学研究所)

分担者: 月田 早智子

(大阪大学大学院医学系研究科)

研究費: 物件費 45万円

[2] 研究経過

[背景と目的] 繊毛 (cilium)は微小管を軸とする細胞外突起構造であり、細胞外の物理的・化学的シグナル、種々の液性因子を受容するアンテナとして胚発生時の形態形成や生体の恒常性維持に重要な働きを担う。生体内を構成するほとんどの細胞が繊毛形成能を保持することから、その構築ならびに機能面の不全は、様々な遺伝性疾患 (繊毛症)の発症と深く関連する。繊毛の基部を成す基底小体(Basal body)は間期中心体の親中心小体に由来する構造体であり、Distal Appendages (DAPs)と Subdistal Appendages (SubDAPs)という2つの突起構造が付随している。DAPsはBasal Bodyの膜直下への繫留、SubDAPsは細胞内微小管ネットワーク構築のための微小管重合核としての役割を担っていると考えられており、繊毛構造ならびにその機能構築において欠かすことのできない重要な構造体である。しかしながら、DAPsおよびSubDAPsの構築機構を担う分子基盤の理解は不十分である。

我々はこれまでに、基底小体関連蛋白質 ODF2の機能解析により、ODF2欠損細胞 (KO)は、DAPsならびにSubDAPsの両中心体付属構造体の形成不全を呈することを明らかにしている (Ishikawa et al., 2005, Nature Cell Biol. 7, 517-524)。さらに、KO細胞へのODF2変異遺伝子の導入実験から、SubDAPsのみの形成不全を呈する ODF2 $\Delta 4/5$ 細胞株を構築することに成功した (Tateishi et al., 2013, J. Cell Biol. 203, 417-425)。本研究では、ODF2が2つの異なる中心体の付属構造体の構築を調節する主要な構成タンパク質であると想定し、ODF2相互作用タンパク質の網羅的解析を通して、DAPsおよびSubDAPsの構築を担う分子基盤を明らかにすることを目的とし

て解析に着手した。

その結果、当初の研究計画通りテトラサイクリン誘導性 ODF2 安定形質発現細胞株の構築、複数の新規 ODF2 相互作用タンパク質の同定に至った (図参照)。

[研究打ち合わせの開催状況など]

採択後、代表者の千葉と加齢医学研究所の菅野講師は3度 [2015年5月 (仙台)、2015年9月 (大阪)、2016年3月 (仙台)]の研究打ち合わせを行った。その都度、計画方針の綿密な打ち合わせ、研究結果の討論を行ってきた。さらに、研究期間中は電子メールで頻りに意見交換し、課題の共有や実験手法の見直しを図ってきた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1. 新規 ODF2 相互作用タンパク質の同定

ODF2 相互作用タンパク質の網羅的解析を目的として、ODF2を安定的に発現する安定形質発現細胞株の樹立に着手した。ODF2の恒常的な過剰発現系が微小管-中心体の恒常性維持、細胞増殖制御に与える影響が懸念されたことから、テトラサイクリン誘導発現システムと

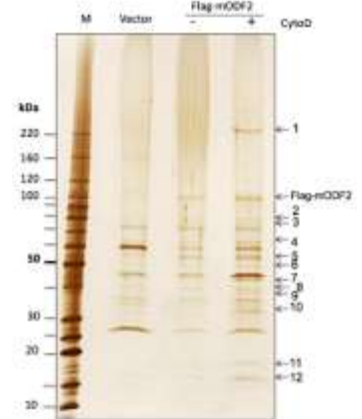


図. Flag-ODF2の共沈物の銀染色像

Flp-in 安定形質発現細胞株構築系を組み合わせた T-Rex 発現システムを採用し、ドキシサイクリン (Dox)投与依存的にFLAG-タグ付加ODF2発現を一過的に発現する細胞株を構築した。

上記の細胞株に対し、DoxならびにCytochalasinDを処理したのちに、細胞内タンパク質の可溶化、Flag-Odf2の免疫沈降、SDS-PAGE, 銀染色による結合タンパク質の可視化、Nano/LC/MS/MS質量分析装置による相互作用タンパク質の質量分析を順次行った。この結果、現在までに複数の相互作用タンパク質の同定に至っている (図参照)。

2. 超解像度顕微鏡による ODF2 相互作用タンパク質の局在解析

中心体を構成する中心小体は全長約 500 nm、直径約 150-250 nm の微細な構造体である。そのため、従来の蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡の分解能では、目的タンパク質の中心小体内局在を詳細に決定することが困難である。本研究では、研究期間内に同定した ODF2 新規相互作用タンパク質(ODF2 interacting protein 1: ODF2IP1 と称する)に関して、従来の光学顕微鏡に比べて最大 2 倍の X,Y 分解能と Z 分解能を持つ構造化照明顕微鏡法 (Structured illumination microscopy : SIM)を用いた超解像度顕微鏡イメージングを行い、詳細な中心体内局在解析を行った。この結果、ODF2IP1 は直径約 190 nm の特徴的な環状構造を呈して親中心小体の遠位部に局在することを見出した。さらに、ODF2IP の中心小体局在ならびにその安定性は ODF2 に依存的であること、ODF2IP 発現抑制細胞と ODF2 欠損細胞、ODF2A/5 細胞では、ともに一部の SubDAPs 構成タンパク質の中心体局在が顕著に阻害されることを見出した。上記の結果は、ODF2IP が ODF2 を介して中心小体上で SubDAPs の構築を担うことを示唆している。

3. ODF2IP1 安定形質発現細胞株の構築と相互作用タンパク質の網羅的解析

ODF2IP1 相互作用タンパク質の網羅的解析を目指し、ODF2 と同様の方法で ODF2IP1 安定形質発現細胞株の樹立を行った。現在までに細胞株の構築を完了しており、今年度中に ODF2IP1 の相互作用タンパク質の同定を目指す。本研究の遂行により、ODF2IP1 ならびに ODF2 を基盤とする SubDAPs 構成の制御基盤の広範な理解を目指していく。

4. マウス気管多繊毛細胞培養システムを用いた中心体構造変換における ODF2IP1 の動態解析

培養細胞系を用いた中心体関連タンパク質の解析は体細胞分裂進行に伴う紡錘体構築、増殖制御異常による細胞死の誘導、物質輸送など中心体・微小管に関わる広範な細胞活動に影響が生じるため、標的タンパク質の”真の中心体制御機能”を解き明かすのは困難である。本研究で採用する Air-liquid interface(ALI)によるマウス気管上皮の初代培養細胞システム (mTEC) はマウス気管上皮に存在する多繊毛前駆細胞を Transwell 上で培養した後、フィルター上側の培養液を除く(ALI)ことで、多繊毛の構築を促すことができる系である。このシステムでは繊毛構築に伴う中心体変換が核膜崩壊を伴わずに起こるため、標的タンパク質の中心体制御機能を解析する上で優れた系であると

言える。本研究では、ODF2IP1 の中心体構造変換、繊毛形成における機能の詳細を明らかにすべく、既にレンチウイルス発現システムによる ODF2IP1 の過剰発現系、shRNA による発現抑制系の構築が完了した。今後、多繊毛発生過程での ODF2IP1 の動態解析を超解像度顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて解析を行っていく予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

私達がこれまでに作成した ODF2 変異細胞株は、DAPs ならびに SubDAPs それぞれの機能や制御基盤を個々に解析するツールとして役立つことが大いに期待される。加えて、本研究は超解像度顕微鏡を用いた中心体構造の詳細な解析、気管多繊毛構築のモデル実験系を利用した組織レベルでの解析といった先鋭的な手法・技術を駆使した研究展開を積極的に遂行しており、ODF2IP1 の機能解析ならびに SubDAPs 構築制御解析を通して、本研究の趣旨である基底小体付属構造体の構築を担う分子基盤が詳細に明らかになっていくことが期待される。SubDAPs の構築異常は原発性繊毛機能不全症と関連することが明らかになっており、本研究は繊毛病の原因究明、新たな病理マーカーの発見、繊毛症治療方針の提案を通じた臨床的な発展への貢献も十分期待される重要な研究課題になると考えられる。

[4] 成果資料

1. 月田早智子, Elisa Herawati, 千葉秀平

基底小体アペンデージによる繊毛形成・アピカル細胞骨格制御機構
新学術研究領域「シリア・中心体による生体情報フローの制御」第 3 回領域会議 2015. 8. 27-28., 倉敷

2. Elisa Herawati, Daisuke Taniguchi, Hatsuho Kanoh, Kazuhiro Tateishi, Shuhei Chiba, Yuki Ogura, Tomoki Yano, Atsushi Tamura, Shuji Ishihara, Sachiko Tsukita

Coordination of basal body orientation in differentiating multiciliated cells: Mechanism revealed by long-term live imaging.

BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 93 回日本生化学会大会 合同大会), 2015.12.1-4., 神戸

3. 月田早智子

Claudin-based Tight Junction (TJ)-Apical Complex as an Organizer of Biological Systems 第 31 回 国際生物学賞記念シンポジウム, 2015. 12. 5-6., 京都