

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

柏原 宏香

(大阪大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 63 万 3 千円，旅費 6 万 7 千円

[2] 研究経過

[背景と目的]

繊毛はその表面に各種受容体やイオンチャネルが高密度に配しており、細胞外の物理的・化学的シグナル、液性因子などの細胞外シグナルを受容するアンテナとして働いている。脊椎動物を構成する細胞のほとんどが繊毛を保持しているが、その構築ならびに機能の不全は発生異常や囊胞性腎疾患、網膜変性や肥満を複合的に呈する遺伝性疾患（繊毛症）の発症と密接に関連する。繊毛の基部を成す基底小体 (BB) に付随する 2 つの突起構造 [Distal Appendages (DAP) と Subdistal Appendages (SAP)] はそれぞれ BB の膜直下への繫留、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おり、繊毛構築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、DAP および SAP の構築機構を担う分子基盤の理解は不十分である。本研究では、中心体/BB 関連蛋白質 ODF2 を中心として、基底小体に存在する 2 つの突起構造である DAP と SAP の構築を担う付属構造体の分子基盤の解明から、その機能的意義の詳細を明示することを目的とする。

我々はこれまで ODF2 欠損 (KO) 細胞は、DAP ならびに SAP の両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、SAP のみの形成不全を呈する ODF2 Δ 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、前年度までに ODF2 相互作用タンパク質の網羅

的解析に着手し、ODF2 新規相互作用関連タンパク質 (ODF2 interacting protein) を同定した。共同研究 2 年目にあたる本年度は、ODF2IP の基底小体構造ならびに繊毛の構築における役割、さらには ODF2IP による機能制御実態の一端を明らかにすべく解析を行った (成果 2 項)。さらに、ODF2IP について共沈物のマスマスペクトロメトリー解析を行い、両者に相互作用が見られる因子の同定に成功した (成果 1 項)。
[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研究打ち合わせを行い、当該年度の研究計画ならびに達成目標を話し合った [2016 年 5 月 (仙台)]。当該研究期間は主に電子メールを通じて頻繁に意見交換し、その都度、課題の共有や実験手法の見直しを図ってきた。また、分担者の柏原は研究代表者と頻繁に討論し、研究計画の遂行に従事してきた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1. プロテオーム解析に基づく ODF2IP 結合蛋白質の探索とマスマスペクトロメトリー解析

ODF2IP 相互作用因子の網羅的解析を行う目的で、ドキシサイクリンの添加によって、これら因子について一過的発現誘導が可能な細胞株を樹立した。その後、細胞内タンパク質の可溶化、Flag-ODF2IP 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に順次着手した。この結果、ODF2 ならびに ODF2IP 両者に共通する共沈因子として Phosphoribosyl Pyrophosphate Synthetase Associated Protein (PRPSAP) を同定した。現時点で、Green Fluorescent Protein (GFP) を融合した PRPSAP(GFP-PRPSAP) が中心体に局在することを実験的に明らかにしており、今後は細胞内共沈実験、in vitro 結合実験により、ODF2 または ODF2IP との相互作用の実態を詳細に明らかにする。

2. ODF2IP の局在・機能およびその制御解析

一般的に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。そこで、本研究

では従来の光学顕微鏡に比べて最大2倍の空間分解能を持つ構造化照明顕微鏡法 (Structured illumination microscopy : SIM)による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、ODF2IPは直径約357nmの特微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(図1参照)。さらに、ODF2IPはODF2が作るSAP構造の安定性に依存してSAPに局在することが明らかになった。加えて、透過型電子顕微鏡を用いた解析により、ODF2IPの欠損細胞はSAPの形成不全を呈することを実験的に明示した。上記の結果は、ODF2IPがODF2を介して中心小体上に局在し、構成タンパク質としてSAPの構築を担うことを示唆する。

< 親中心体頂端面 >

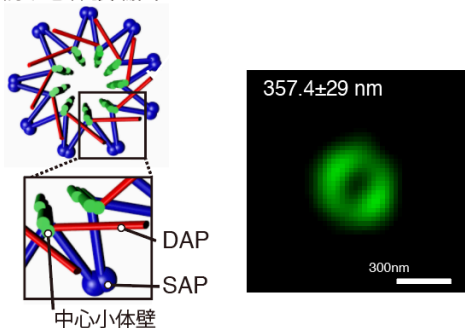


図 1. ODF2IP は中心体上で環状構造を呈する。 (左)SAP, DAP は中心小体壁から放射状に伸びる。(右)GFP融合型ODF2IPのSIM画像(横断面)。数値はリング直径を示す。Bar, 300 nm

3. 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ODF2IP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。繊毛構築の過程では中心体変換が核膜崩壊を伴わずに起こるため、標的タンパク質の真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。中心小体マーカー蛋白質CentrinにGFPを融合したCentrin-GFPマウスからmTECを構築したところ、マウス気管多繊毛細胞の基底小体に近接する位置にODF2IPが局在することを見出した。現在、蛍光タンパク質融合ODF2IPを発現するトランスジェニックマウスの作製を計画して

おり、今後、気管多繊毛上皮細胞の発生過程におけるODF2IPの動態解析に着手する予定である。またレンチウイルス発現システムによる発現抑制実験を敢行し、多繊毛発生過程でのODF2IP1の機能やノックアウトマウスの病態解析など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、DAPならびにSAP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/BB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、ODF2IPの機能解析ならびにSAP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。我々はすでに、ODF2IPが休止期への移行にかけての発現レベルが減少すること、ODF2IPの発現抑制が細胞増殖層から休止期への移行(増殖阻害)と繊毛の形成を誘導することを見出しており、“中心体構成タンパク質による細胞周期制御システム”という、新規シグナル経路の実態解明に向けて解析を進めている。SAP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(主なものを示す)

1. Dynamic Remodeling of Membrane Composition Drives Cell Cycle through Primary Cilia Excision. Phua SC, Chiba S, Suzuki M, Su E, Roberson EC, Pusapati GV, Setou M, Rohatgi R, Reiter JF, Ikegami K, Inoue T. *Cell.* (2017) 168, 264-279.
2. Chiba S, Kashihara H, Tsukita S. Molecular basis and hierarchical assembly of centriole/basal body appendage in mammalian cells
シンポジウム招待講演
第39回日本分子生物学会年会(横浜)