

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

(大阪市立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)

研究費：物件費 28 万 3 千円，旅費 1 万 7 千円

[2] 研究経過

[背景と目的]

一次繊毛は細胞外の物理的・化学的刺激、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の役割を担っており、その構造面・機能面の欠陥は発生異常や嚢胞性腎疾患、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。細胞が血清飢餓や細胞間接触により増殖相から休止相(G0期)に移行すると、中心体を構成する2つの中心小体(親中心小体、娘中心小体)のうち、特徴的な付属構造体である Distal Appendages (DAP)と Subdistal Appendages (SAP)を保持する親中心小体は基底小体(Basalbody:BB)へと変換され、遠位部からの軸系伸長を伴って、一次繊毛が形成される(図1)。一連の中心体-BBの構造変換は細胞周期依存的に起こると想定されているが、現時点では中心体の構造変化を細胞周期と連動させる機構の詳細は不明である。DAPは一次繊毛形成の初期段階でBBの膜直下への繫留に必要である。一方で、SAPの欠損は一次繊毛の形成自体には必須でないものの、一次繊毛の機能構築における役割はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究は基底小体付属構造体、特にSAPについて、その分子基盤ならびに構成機序の解明を足がかりとして、未だに不明な点が多く残され

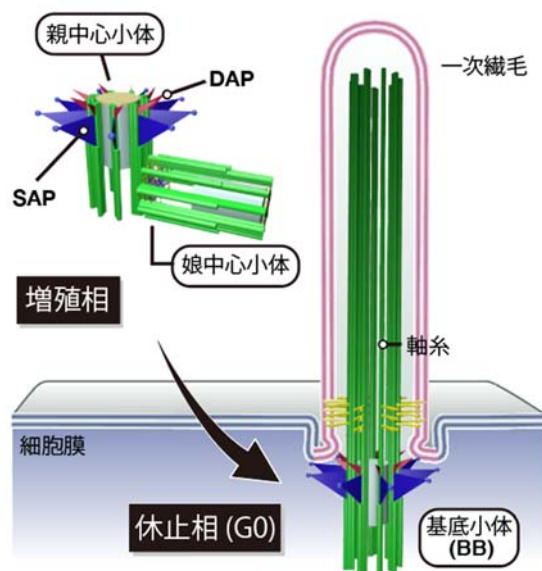


図1: 中心体と基底小体の構造と各構成部位の名称

ている細胞周期と中心体・BB構造変化の密接な連動性を生む分子システムを明らかにすることを目的とする。

中心体関連因子 ODF2 の欠失(KO)細胞は、DAP および SAP の形成不全を呈する。一方で、KO 細胞への ODF2 変異遺伝子の導入は SAP のみの形成不全を呈する (Tateishi et al. J.Cell Biol. 2013)。上記の結果は、ODF2 が 2 つの突起構造の形成の基礎となる重要な因子であることを示す。本研究はプロテオミクス技術を基盤とする ODF2 相互作用蛋白質の網羅的解析を皮切りとして平成 27 年度にスタートし、前年度までに複数の ODF2 相互作用タンパク質 (ODF2 interacting protein: ODF2IP) の同定に成功した。本年度は前年度に引き続き、ODF2IP のひとつである Cep128 について、基底小体構造、繊毛構築、細胞周期進行に果たす役割を解析した。さらに、ODF2、Cep128 の相互作用蛋白質について、既存オミクスデータの統合的解析を行い、両者に相互作用すると想定される候補因子に関して、その局在解析ならびに相互作用解析を行った。

[研究打ち合わせの開催状況]

当該年度の研究計画、達成目標は代表者の千葉と菅野講師は主に電子メールが通じて連絡をとりあい設定した。進捗状況については頻繁に連絡をとりあい、その都度、課題の共有や実験手法の見直しを図ってきた。本年度3月には、千葉が加齢研を訪れ、これまでの成果をまとめた学術論文の投稿に向けた具体的なプロセスを話し合った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

前年度までに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と電子顕微鏡による解析から、Cep128がODF2依存的にSAPに局在すること、Cep128欠損細胞はSAPの形成不全を呈すること、ODF2-Cep128が階層最上位として既知SAP分子の中心体局在を制御することを見出した。本年度はCep128の相互作用因子として新規に見出した細胞周期制御因子について、細胞内免疫沈降法と*in vitro*結合実験による相互作用解析を行い、この因子がCep128との結合により中心体に局在し、活性が亢進することを見出した。この因子は細胞周期G1-S期の移行に欠くことのできない重要な因子として知られるが、実際、Cep128の欠損細胞ではG1-S期への移行が著しく阻害され、細胞は休止期へと積極的に移行し、繊毛を形成することが明らかになった。これらの成果については現在、学術論文投稿に向けて準備している。加えて、菅野講師は*in silico*解析によって新たに相互作用すると想定される因子を見出しており、今後この因子に関しても相互作用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

これまでに構築した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。さらに、ODF2-Cep128を起点として、中心体・基底小体付随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。本研究では、上述の通りCep128の発現抑制が増殖相から休止相への移行(増殖阻害)と一次繊毛の形成を促進することを見出している。一部の組織では増殖と分化への移行にかけてSAPが消失することが報告されており、付随構造体の構築制御自体が細胞周期の進行を制御することも想定される。現時点では細胞周期が中心体・

BB構造変換を制御するのか、中心体・BB構造変換が細胞周期を制御しうるのか、はたまたその両方が連携しあうことで細胞周期と中心体・BB構造変化の密接な連動性が生まれるのかを示す決定的な証拠は見いだせていないが、本研究を足がかりとして”中心体による細胞周期制御システム”という新しい概念の提唱に加えて、その一端を担うと想定される分子システムの全貌が明らかになることが期待される。また、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、本研究で得られた成果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などの臨床面での応用へと派生することが期待される。

[4] 成果資料(主なものを示す)

1. 『超解像度技術の一次繊毛解析への応用』 千葉秀平 (2018) 羊土社 実験医学 4月号 Vol.36. 970-971
2. Glucose deprivation induces primary cilium formation through mTORC1 inactivation. Takahashi, K. Nagai, T., Chiba, S., Nakayama, K., Mizuno, K. (2018) *J. Cell Sci.* 131, jcs208769. doi:10.1242/jcs.208769
3. 「一次繊毛形成と細胞周期を制御する中心体の分子基盤」 柏原宏香、千葉秀平、加藤洋平、菅野新一郎、中山和久、矢野智樹、月田早智子 (2018) 生体運動研究合同班会議プログラム. 1月5-7日 法政大学市ヶ谷キャンパス
4. 膨張顕微鏡法を用いた一次繊毛の超解像イメージング」 加藤洋平、千葉秀平、中山和久 (2017) 生命科学系学会合同年次大会. 12月6-9日. 兵庫・神戸国際会議場
5. 「中心体機能制御インターフェースとしてのアペンデージ構造の分子基盤」 柏原宏香、千葉秀平、菅野新一郎、月田早智子 (2017) 第69回日本細胞生物学会大会シンポジウム. 6月5日-8日 宮城・仙台国際センター