

増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構

[1] 組織

代表者: 水野 健作
(東北大学大学院生命科学研究科)

対応者: 安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

分担者: 菅野新一郎
(東北大学加齢医学研究所)

大橋 一正
(東北大学大学院生命科学研究科)

永井友朗
(東北大学大学院生命科学研究科)

研究費: 物件費 30 万円

[2] 研究経過

多くの細胞は一次繊毛とよばれる非運動性の繊毛を有している。一次繊毛は細胞外からの機械的刺激やHedgehogなどのシグナルを受容、伝達するアンテナとして機能しており、その形成不全は多発性嚢胞腎、網膜変性、肥満、精神遅滞など繊毛病と総称される疾患を引き起こすことが知られている。また、多くの癌細胞では一次繊毛が消失しており、一次繊毛は細胞の増殖・分化を制御し、個体の発生・恒常性維持や癌化にも関与することが示唆されている。

一次繊毛は細胞休止期に形成されるが、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構は不明である。血清飢餓などの刺激によって細胞が休止期へ移行すると、中心体が細胞膜へ移行し、母中心小体が細胞膜に繫留され、母中心小体遠位から軸糸微小管が伸長し、一次繊毛が形成される。Cep97とCP110は、母及び娘中心小体遠位に局在する蛋白質で、増殖相では中心小体からの微小管伸長を阻害しているが、細胞がG0期へ移行すると、母中心小体から特異的に除去され、その結果、軸糸微小管の伸長が開始される(図1)。このようにCep97とCP110の母中心小体からの除去は繊毛形成において中心的な役割を果たしているが、Cep97/CP110の除去機構ならびにCep97/CP110除去による軸糸

微小管の伸長開始機構は不明である。また、Cep104は、増殖期には母中心小体に局在しCep97/CP110と結合しており、休止期にはCep97/CP110から解離し繊毛の先端に局在するが、その機能は不明である(図1)。本研究では、1) Cep97/CP110の除去機構及び、2) Cep97/CP110除去による軸糸微小管の伸長開始機構(特にCep104の機能)を解明し、増殖抑制シグナル依存的な一次繊毛形成機構を解明することを目的として研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

1) 一次繊毛形成におけるCep97/CP110の除去機構:
血清飢餓刺激によってCep97蛋白質がユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることを見出した。また、この分解にはユビキチンE3リガーゼの成分であるCullin-3 (Cul3)が関与することを見出した。加齢研プロテオーム寄附研究部門の菅野、安井博士との共同研究により、Cep97と結合するBTB含有蛋白質の同定を試みている。

2) Cep97/CP110除去による軸糸微小管の伸長機構:
Cep97/CP110の除去による軸糸微小管の伸長機構を解明するため、加齢研の菅野、安井博士との共同研究によりCep97結合蛋白質のプロテオミクス解析を行い種々のCep97結合蛋白質を同定した。しかし、微小管の伸長に関与する蛋白質を同定することはできなかった。一方、Cep97、CP110と結合する蛋白質としてCep104が最近同定された。私達は、Cep104の一次繊毛形成における機能解析を行い、Cep104のTOGドメインが微小管重合促進活性を有しており、TOGドメインを介して一次繊毛の軸糸の伸長に関与することを明らかにした。

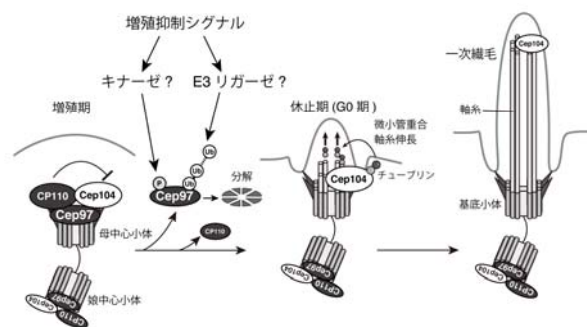


図1. Cep97の分解とCep104の活性化による一次繊毛形成の開始機構モデル。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

1) 一次繊毛形成におけるCep97/CP110の除去機構:

ヒト網膜色素上皮由来RPE1細胞を培養し、血清飢餓刺激およびプロテアソーム阻害剤であるMG-132を同時に加え、CP110、Cep97の蛋白質の量を検出した。その結果、通常は時間依存的にCep97の量が減少するが、MG-132処理によってその量が顕著に増加することが明らかとなった。また、血清飢餓条件下でMG-132処理すると、コントロールの細胞ではCep97が娘中心体のみ局在するが、MG-132で処理した細胞ではCep97が中心体近傍に強く集積する様子が観察された。HEK293T細胞を用いてCep97に対する細胞内ユビキチン化アッセイを行った結果、Cep97がポリユビキチン化修飾を受けることが明らかになった。以上の結果から、Cep97は血清飢餓条件下においてユビキチン-プロテアソーム依存的に分解されることが示唆された。

次に、Cep97のユビキチン化が予測される3箇所のLysをArgに置換した変異体(3KR)を作製し、この変異体を用いて細胞内ユビキチン化アッセイを行った結果、野生型Cep97に比べて3KR変異体ではユビキチン化が減少することが明らかとなった。Cep97の3KR変異体を過剰発現した細胞では、一次繊毛形成率及びCP110が母中心小体から除去された細胞の比率が野生型Cep97を発現させた細胞よりも有意に減少した。以上の結果から、Cep97のユビキチン化は母中心小体からのCP110の除去および一次繊毛形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Cep97の分解機構を解明するため、Cep97の分解に関与するE3ユビキチンリガーゼの同定を試みた。RPE1細胞をNEDD8活性化因子阻害剤であるMLN4924で処理した結果、Cep97の蛋白量が増加することが示された。NEDD8はCullin Ring-typeのE3リガーゼ(CRLs)を活性化することから、CRLsがCep97のユビキチン化に関与する事が示唆された。8種類のCullinに対するsiRNAを用いて発現抑制実験を行い、一次繊毛形成率およびCep97が中心体近傍に集積した細胞の比率を定量した結果、Cul3の発現抑制によって一次繊毛形成率が有意に抑制され、Cep97の中心体近傍への集積が有意に促進された。以上の結果から、血清飢餓刺激による一次繊毛形成の開始過程におけるCep97の分解と母中心小体からの除去にはCul3が関与することが示された。

2) Cep97/CP110除去による軸糸微小管の伸長機構:

Cep104は、繊毛病の一種であるジュベール症候群の原因遺伝子として最近同定された中心体蛋白

質であり、繊毛先端に局在する。また、Cep104はCep97/CP110と相互作用するが、増殖抑制刺激依存的な一次繊毛形成におけるCep104の機能は未解明である。RPE1細胞においてCep104の発現抑制を行ったところ、一次繊毛形成の初期段階で起こる母中心小体からのCP110の除去や、一次繊毛形成頻度への影響は見られなかったが、一次繊毛の顕著な短縮が観察された。Cep104はチューブリン結合ドメインであるTOGドメインが存在するが、Cep104のTOGドメインの組換え精製タンパク質を用いた*in vitro*微小管重合アッセイを行い、Cep104のTOGドメインが微小管重合促進活性をもつことを見出した。さらに、Cep104の発現抑制による軸糸の短縮は、野生型Cep104の発現で回復するが、微小管重合促進活性のないTOGドメイン変異体では回復しなかった。以上の結果から、Cep104は増殖抑制刺激依存的にCep97/CP110から解離し、一次繊毛形成過程における軸糸微小管の重合促進に関与することが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、ユビキチン・プロテアソーム依存的なCep97の分解が、増殖抑制刺激依存的なCP110の除去および一次繊毛形成に必要なことが明らかになり、Cul3がCep97の分解に関与するE3リガーゼの成分であることを明らかにした。Cep97の分解はCP110の不安定化及び母中心小体からの解離を促すことから、一次繊毛形成の初期段階の重要なステップを担うと考えられる。Cul3とCep97の結合を仲介する分子を同定することが重要な課題であり、現在進行中である。さらに詳細な分子機構を解明することによって、細胞の増殖、分化と一次繊毛形成をつなぐ新しいシグナル経路が明らかとなり、繊毛病の病因解明や細胞がん化の機構解明にも貢献することが期待される。

[4] 成果資料

学会発表

(1) Mukoyama, S., Nagai, T. and Mizuno, K: Role of Cep97 degradation in growth-arrest-induced ciliogenesis. Consortium of Biological Sciences 2017. Kobe, 2017. 12. 6-9.

(2) Yamazoe, T., Umeda, S., Sugaya, Y., Nagai, T. and Mizuno, K: Centrosomal protein Cep104 promotes microtubule polymerization and regulates ciliary length. Consortium of Biological Sciences 2017. Kobe, 2017. 12. 6-9.