

## 一次繊毛の形成と恒常性維持を担う分子基盤の解明

### [1] 組織

代表者：千葉 秀平

(大阪市立大学医学部)

対応者：菅野 新一郎

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 18 万円

### [2] 研究経過

#### [背景と目的]

一次繊毛は大半の哺乳類細胞が形成する能力を保持する小さな細胞外突起であり、構造全体をとりまく繊毛膜、間期中心小体に由来する基底小体、そこから伸びた軸糸を基本構成要素とする。繊毛膜には、発段階の主要なシグナルであるヘッジホッグ (Hh) 経路や各種液性因子の受容体やイオンチャネルが偏在しており、細胞は一次繊毛を介して化学的・機械的シグナルといった細胞外環境を受容する。一次繊毛の機能的・構造的欠陥は網膜変性や嚢胞性腎疾患、肥満や多指といった症状を複合的に呈する遺伝性疾患（繊毛症）と密接に関連することから、一次繊毛の形成やその恒常性維持を担う分子基盤の全貌解明は早急な解決が望まれる研究課題である。

我々は、近年、遺伝子変異による一次繊毛構築の異常と Hh 経路の伝達障害による発生期の形態形成異常を呈することが報告された低分子量 GTPase (以下 SGP) について、CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウト (KO) したヒト網膜色素上皮細胞株を確立した。SGP-KO 細胞では SGP の野生型 (WT) の導入時に一次繊毛の構築が回復する一方で、GTPase 活性を欠いた恒常的不活性変異体である SGP (TN) を発現させた場合には繊毛形成能が回復しなかった。さらに、SGP-KO 細胞でごく低頻度で形成される一次繊毛は Hh シグナルの活性化によって引き起こされる GPR161 の繊毛外輸送が著しく損なわれていることを見出した。Airyscan 顕微鏡による超解像イメージングにより、SGP の細胞内局在を検証した結果、SGP は一次繊毛形成依存的に基底小体遠位部に集積することが判明した。以上の結果から、SGP が繊毛基底部で一次繊毛の構築を制御すること、構築後の一次繊毛では Hh シ

グナル制御に関わる可能性が示唆された。しかしながら、一次繊毛形成の局面で SGP の空間配置を制御する分子機構は未だに不明であり、SGP の GTPase 活性制御機構やその下流エフェクタータンパク質を介した一次繊毛形成制御システムについても不明のままである。そこで、本研究はプロテオーム技術による SGP 相互作用タンパク質の網羅的解析と超解像顕微鏡イメージングによる繊毛関連タンパク質の空間配置解析を解析基盤として、SGP を中心とした一次繊毛構築の新規制御機構の解明を目的として解析を行った。

#### [研究打ち合わせの開催状況]

研究代表者と菅野講師は当該期間中、主に電子メールを通じて連絡をとりあい、その都度、課題の共有や実験手法の見直しを図ってきた。研究課題の採択後、研究代表者は上述の細胞株の構築に着手し、2019 年 11 月に代表者が調製したタンパク質精製試料をもとに、菅野講師が質量分析を施行した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

##### A) 超解像顕微鏡を用いた SGP の細胞内局在解析

一次繊毛の構成要素である基底小体は光学限界に迫る極微小な円筒構造体 (500nm×200nm) である。したがって、一般的な光学顕微鏡 (分解能約 200nm) では、この構造体近傍で対象分子の正確な空間配置を解析することは極めて困難である。我々は、最大空間分解能 140nm をもつ Airyscan 型超解像顕微鏡を駆使して内在性 SGP の細胞内局在を検証し、基底小体遠位側の移行帯とよばれる部位に SGP が付近に局在することを見出した。一次繊毛は① CP110-Cep97、MPP7 をはじめとする Capping protein の中心小体からの離脱、② 繊毛小胞と呼ばれる膜構造体の中心体遠位側への集積、③ 軸糸の伸長、という一連の過程を経て形成される。一次繊毛形成誘導後に超解像顕微鏡を用いて SGP-KO 細胞内の関連タンパク質の動態を経時的に解析した結果、①の過程は対照細胞同様に起こる一方で、②以降の過程が顕著に阻害されることを見出した。

## B) SGP 相互作用タンパク質の網羅的解析

KO 細胞で異常が見られた繊毛小胞の形成は、本来、中心体近傍でのアクチン線維の重合が必要であることが最近報告された。しかしながら、SGP による中心体近傍アクチン線維の重合制御実体は全くの不明であった。そこで、SGP の相互作用タンパク質 (SGP-IP) の同定を目的に、SGP-KO 細胞に LAP-tag (S tag-HRV3 protease 認識配列-GFP) を付加した SGP (WT)、または SGP (TN) を導入した後、二段階の免疫沈降を行い、SGP ならびに SGP-IP を精製した。NanoLC/MS 質量分析の結果、複数の相互作用タンパク質の同定することに成功した (図参照)。なかでも、125 kDa の SGP-IP1 は親中心小体に存在する付属構造体である Distal appendage の構成因子として知られる ANKRD26 のホモログであり、興味深いことにその C 末端部分はほぼ完全な  $\beta$  アクチン配列をコードすることが判明した。SGP-IP1 の繊毛形成や Hh シグナル制御における役割は現時点では不明であり、SGP との相互作用機構や SGP-IP によるアクチン制御実体についても現在解析中であるが、これまでに超解像レベルでの内在性の SGP-AIP1 の空間配置により、SGP-AIP1 は親中心小体の遠位側末端部分に局在することを見出している。

### (3-2) 波及効果と発展性など

近年、アクチン線維上を動くモーターである MyosinVa が繊毛小胞の形成に必要であることが明らかになった。さらに、単離精製した中心体が *in vitro* でアクチン重合活性を保持するという驚くべき報告がなされた。これらの結果は、中心体を重合起点とするアクチン線維の動態制御が一次繊毛の形成に深く関与することを強く示唆している。アクチンは生体内タンパク質の中で最も存在量が豊富で、多様な制御因子がその重合状態と機能を制御することが知られるが、一般的な光学顕微鏡では回折限界に迫るごく微小なオルガネラである中心体近傍から発せられる微弱シグナルを細胞質に存在するアクチン線維が発する強大なバックグラウンドシグナルの中で検出するのは困難であり、この場所で局所的に機能を発揮するはずのアクチン構造やその調節因子の存在は詳しく解析されてこなかった。超解像イメージングを基盤とした中心体近傍アクチンの動態制御ならびに SGP-SGP-IP1 の機能制御機構の解析は未だに不明な点が多いアクチンを介した一次繊毛形成制御機構の解明につながる可能性がある。また、ここで得られる成果は繊毛症の発症メカニズム解明にむけた新展開へと派生することが期待され、将来的に新たな病理マーカーの発見や繊毛症治療方針の提案など臨床的な応用へとつながることが期待される。

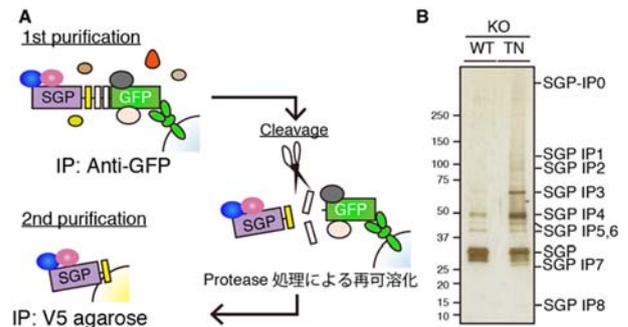


図: SGP 相互作用タンパク質の探索  
A. 構築した細胞株を可溶化後、GFP 抗体による免疫沈降、Precision protease による再可溶化、S agarose による免疫沈降の手順を経て SGP 相互作用タンパク質を精製した。  
B. 銀染色の結果、複数の SGP 相互作用分子の存在を確認した。

## [4] 成果資料

1. Cep128 associates with Odf2 to form the subdistal appendage of the centriole. Kashiwara H.\*, Chiba S.\* †, Kanno S., Suzuki K., Yano T., Tsukita S†. *Genes Cell*. 2019;24 (3)231-243. (\*equally contributed and corresponding)
2. RABL2 positively controls localization of GPCRs in mammalian primary cilia. Dateyama I, Sugihara Y, Chiba S, Ota R, Nakagawa R, Kobayashi T, Itoh H. *Journal of Cell Science*. 2019;132(2):jcs224428.