

## 網羅的プロテオミクス解析に基づく繊毛基部の 脂質構成制御の解析

### [1] 組織

代表者：千葉 秀平

(大阪市立大学大学院医学研究科)

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 20 万円

### [2] 研究経過

#### [背景と目的]

脊椎動物細胞の大半が細胞増殖を休止させる条件で、細胞表面に長さ約  $2\text{-}10\mu\text{m}$  のごく小さな突起構造である一本の非運動性繊毛（一次繊毛）を形成する。一見、繊毛膜は細胞膜とひと続きだが、二つの区画はタンパク質・脂質組成の両面で一線を画し、細胞は繊毛膜に特異的に局在した GPCR やイオンチャネルを介して細胞外環境を感知する。繊毛の構造や機能の異常は、網膜変性や多指、嚢胞性腎疾患、網膜変性や骨形成異常などを複合的に呈する繊毛症の発症と密接に関連することから、この構造体の形成や機能構築を担う分子基盤、さらには繊毛膜独自のタンパク質・脂質構成を組織化するための分子システムの理解は医学的にも解決が望まれる喫緊の研究課題である。私たちは最近、一次繊毛基部に存在する移行帯 (Transition zone: Tz) 近傍に局在することが近年報告されたコレステロール合成酵素について、CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト (KO) 細胞を確立し、その KO 細胞では一次繊毛の形成が顕著に阻害されること、特定膜タンパク質の繊毛膜局在が減退および消失することを実験的に明らかにした。しかしながら現時点で、この異常がどのような分子システムの

破綻に基づいて生じるのか詳しく明らかになっていない。そこで、本研究では、当該酵素遺伝子の KO 細胞に、精製用タグ付きタンパク質をレンチウイルスシステムで発現させ、安定形質発現細胞株由来の細胞溶解液中から、コレステロール合成酵素を精製し、相互作用タンパク質を網羅的に解析することとした。

#### [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。当該期間は主に電子メールを通じて意見交換し、その都度、課題の共有や実験手法の見直しを図った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

微細オルガネラである中心小体/基底小体（大きさ約  $200\times 500\text{nm}$ ）やその近傍で機能を果たす対象分子の動態や空間配置を一般的な光学顕微鏡で正確に捉えることは困難であり、こうした狭小領域から発せられる微弱シグナルを細胞質に存在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至難の技である。内在性のタンパク質を認識する特異的な抗体を用いて観察した結果、目的とするコレステロール合成酵素が繊毛基部に局在する様子が確認された。一方、KO 細胞ではこのシグナルが消失していたことから、対象分子が一次繊毛の基部に局在することが明らかになった (図参照)。

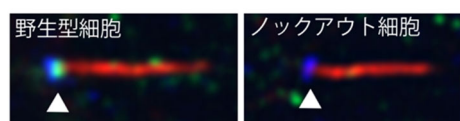


図. コレステロール合成酵素の局在検証

コレステロール合成酵素の相互作用タンパク質の網羅的解析を目指し、コレステロール合成酵素のカルボキシ末端に蛍光タンパク質 GFP と精製用 FLAG タグをタンデムに付加した当該タンパク質を CMV プロモーターの制御下で安定的に発現する細胞株を構築した。

取得した細胞株は、当該コレステロール合成酵素を安定的に発現することを確認したが、その一方で、通常は血清飢餓によって誘導される一次繊毛形成が強く阻害されることが明らかになった。さらに、この細胞株において、当該分子の局在を超解像顕微鏡で観察することができなかった。この結果は、内在性の分子レベルを上回る過剰量のタンパク質の恒常的な発現、または蛍光タンパク質の融合による対象分子の異所的な局在の結果生じたものであると想定された。そこで、次に対象遺伝子をコードする末端ゲノム領域について、Cas12a を用いて二本鎖切断 (Double strand break: DSB) を起こし、ホモロジーアームを両端に付加した直鎖状の精製用タグ配列を共導入することで、相同性組み換えを介して、対象遺伝子の C 末端にタグを付加することとした。しかしながら、本研究で使用したヒト網膜色素上皮細胞株は、相同性組み換え修復の頻度が低く、目的の配列がゲノム中に挿入された細胞株を得ることができなかった。そこで、現在は二本鎖切断活性を持たない不活性型 Cas9(dCas9) と一本鎖アニーリングタンパク質を介した組み換え酵素の目的部位へのターゲティング法を新たに導入し、ノックイン細胞の樹立を目指している。この方法の採用により、内在性プロモーターの制御下で対象遺伝子の発現を誘導し、望ましくない時期や場所で大量の活性保持タンパク質が蓄積するのを防ぎ、繊毛の機能構築に与える影響が低減されることが期待される。細胞株の構築後、速やかに相互作用タンパク質の解析に着手する予定である。

### (3-2) 波及効果と発展性など

現時点で当該酵素の一次繊毛基部への集積を制御する分子機構や分子間相互作用実態は不明である。本研究による内在性分子へのタグ配列付加を通じた網

羅的プロテオミクス解析はいまだに不明な点が多い。繊毛の脂質制御機構について重要な知見となることが考えられる。相互作用機構の実態解明を通じて脂質制御機構の破綻と繊毛症の発症の因果関係を究明へとつながることが期待される。

### [4] 成果資料

1. ARL3 and ARL13B GTPases participate in distinct steps of INPP5E targeting to the ciliary membrane. Fujisawa S, Qiu H, Nozaki S, Chiba S, Katoh Y, Nakayama K., *Biology open* 2021 Sep 15;10(9):bio058843. doi: 10.1242/bio.058843.
2. Molecular basis of ciliary defects caused by compound heterozygous IFT144/WDR19 mutations found in cranioectodermal dysplasia. Ishida Y, Kobayashi T, Chiba S, Katoh Y, Nakayama K., *Hum Mol Genet.* 2021 Apr 26;30(3-4):213-225. doi: 10.1093/hmg/ddab034. PMID: 33517396.
3. Formation of the B9-domain protein complex MKS1-B9D2-B9D1 is essential as a diffusion barrier for ciliary membrane proteins. Okazaki M, Kobayashi T, Chiba S, Takei R, Liang L, Nakayama K, Katoh Y., *Mol Biol Cell.* 2020;31(20):2259-2268. doi:10.1091/mbc.E20-03-0208
4. Practical method for superresolution imaging of primary cilia and centrioles by expansion microscopy using an amplibody for fluorescence signal amplification. Katoh Y, Chiba S, Nakayama S., *Mol Biol Cell.* 2020;31(20):2195-2206. doi:10.1091/mbc.E20-04-0250
5. 超解像イメージングを駆使した一次繊毛トランジション・ゾーンの構築様式の解析 ○千葉秀平, 加藤洋平, 中山和久, 第 44 回日本分子生物学会年会 2021 年 12 月 2 日
6. 繊毛形成と繊毛内タンパク質の輸送基盤 ○中山和久, ○加藤洋平, ○千葉秀平 第 94 回日本生化学会大会 2021 年 11 月 3 日 (学会発表は講演者を○で示す。)