

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590261

研究課題名(和文)線毛発生における基底小体からの線毛伸長のon/off制御機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of elongation of primary cilia from basal bodies in ciliogenesis

## 研究代表者

萩原 治夫(Hagiwara, Haruo)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：80189464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：線毛のアクソネーム微小管を構成するアルファチューブリンはアセチル化修飾を受けているが、その意義は不明である。本研究課題では線毛伸長制御機構、特に線毛伸長におけるチューブリンアセチル化の役割を明らかにすることを目的として、チューブリンアセチル化酵素(alphaTAT1)に焦点を当て、一次線毛発現培養細胞や動物組織を用いて分子解剖学的に解析を進めた。ヒト線維芽細胞株KD細胞を用いた解析から、alphaTAT1は基底小体の基部領域に局在し、塩化リチウムによる細胞内アルファチューブリンのアセチル化を促進することで一次線毛の伸長に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia, an organelle found on nearly every cell in the human body, contain an axoneme, which is composed of microtubules and their associated structures. Lithium ion is known to promote the elongation of primary cilia in a variety of cell types, but it is unknown whether lithium is involved in the acetylation of alpha-tubulin in cilia. Because the acetylation of alpha-tubulin may be important for the elongation of primary cilia, in this study we examined the effects of lithium chloride (LiCl) treatments on the acetylation of alpha-tubulin and length of primary cilia in human fibroblast KD cells. We also investigated the involvement of alphaTAT1 (alpha-tubulin N-acetyltransferase 1) in the signaling pathway mediating glycogen synthase kinase-3beta(GSK-3beta) and adenylate cyclase III. Our results suggested that LiCl treatments activate alphaTAT1 by the inhibition of GSK-3 beta and promote the alpha-tubulin acetylation, and then elongate the primary cilia.

研究分野：解剖学

キーワード：線毛 線毛形成 アセチル化チューブリン 基底小体

## 1. 研究開始当初の背景

線毛には、線毛細胞にみられる運動線毛と一次線毛の2つが区別される。線毛形成の全プロセスを線毛発生といい、中心子(基底小体)の複製、複製中心子(基底小体)の移動、基底小体付属構造の形成、線毛の伸長という4段階からなる。また、一次線毛形成は既存の母中心子(基底小体)を用いて行われるので、~の段階からなる。線毛は、細胞膜直下に移動した基底小体の遠位端でチューブリン分子が重合して微小管が伸長することにより形成される。基底小体から細胞質内に向かって微小管が伸長し、細胞質内線毛が形成されることもある。このように細胞種に応じた線毛形成機構の存在が知られているが、基底小体からの微小管伸長という線毛形成の根幹に関わる最初の分子システムについては未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

一次線毛は、既存の中心子の一方から微小管が伸長することにより形成されるが、すべての細胞で一次線毛が形成されるのではなく、特定の限られた細胞種に起こる。これらの事象から考えられるのは、中心子すなわち基底小体の遠位端には、微小管の重合阻止または促進の分子機構が存在し、そのスイッチのオン・オフにより微小管の重合すなわち線毛形成が惹起すると考えられる。オン・オフスイッチの候補としてはセントリンや Nek2 などの基底小体周囲に局在するタンパク質だけでなく、微小管構成タンパク質であるチューブリンの翻訳後修飾、特にアセチル化も線毛伸長に何らかの関与をしていることが推測される。このことから、本研究では基底小体からの線毛伸長調節機構の解明を目指し、チューブリンのアセチル化調節に関与する酵素の細胞内局在を分子解剖学的に明らかにし、微小管構成タンパク質チューブリンのアセチル化修飾と線毛伸長との関係について細胞生物学的に解析を進めた。

## 3. 研究の方法

(1) アルファチューブリンアセチル化関連酵素群の細胞内局在を明らかにするために、アルファチューブリンアセチル化酵素(alphaTAT1)と脱アセチル化酵素(HDAC6)に対する特異的な抗体と線毛や中心体、微小管関連分子に対する抗体とともに一次線毛発現繊維芽細胞株(3Y1beta細胞、KD細胞)に対して免疫組織化学的解析を行った。また、各酵素と GFP の融合タンパク質を発現できるプラスミドを構築し、前述の培養細胞を用いて過剰発現実験を行い、同様に細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡観察により明らかにした。

(2) 塩化リチウムを添加すると培養細胞内の一次線毛が伸長することが報告されてい

ることから、培養期間の異なった KD 細胞に対して塩化リチウムの添加実験を行い、線毛伸長率や線毛保有細胞率について免疫組織化学的解析を行うとともに、細胞内アルファチューブリンのアセチル化変動についてもウエスタンブロット解析を行い、塩化リチウムによる線毛伸長作用とアルファチューブリンアセチル化の関係を解析した。

(3) 塩化リチウムによるアルファチューブリンアセチル化に対する alphaTAT1 の関与を明らかにするために、alphaTAT1 に特異的な siRNA を KD 細胞にトランスフェクションし、ロックダウン実験を行った際の塩化リチウムの効果を調べた。

(4) 塩化リチウム刺激で活性化する細胞内シグナル伝達経路を明らかにするためグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3beta(GSK-3beta)、アデニル酸シクラーゼ III(ACIII)の発現変動およびリン酸化について、ウエスタンブロット法によって解析した。

(5) (1)~(3)の解析から、線毛伸長に対してチューブリンのアセチル化が重要な役割を果たすことが示されたため、成体ラットにおける線毛保有細胞での alphaTAT1 の細胞内局在を免疫組織化学的および免疫細胞化学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) alphaTAT1 と HDAC6 に対する特異的抗体を用いた培養細胞の免疫染色や GFP 融合タンパク質の過剰発現実験の結果、HDAC6 は細胞質内全域に局在が見られたが、アセチル化チューブリンとの局在についての規則性は認められず、一方で alphaTAT1 は細胞分裂時の紡錘体に加えて一次線毛を伸長した基底小体の基部領域に強く発現し、線毛形成に深く関係することが予想された。

(2) 塩化リチウムと線毛伸長の関係を明らかにするために、継代 3 日および 7 日後の KD 細胞に対して塩化リチウム添加実験を施した。その結果、濃度依存的に有意な一次線毛の伸長効果が免疫組織化学的手法により観察された。また、細胞内アルファチューブリンのアセチル化が増加することがウエスタンブロット解析により明らかになった。

(3) 塩化リチウム添加によるアルファチューブリンのアセチル化は siRNA を用いた alphaTAT1 発現抑制により有意に抑制された。

(4) 塩化リチウム刺激によって KD 細胞内における GSK-3beta の発現量とその不活性化型であるリン酸化 GSK-3beta が有意に増加することが明らかとなった。これは siRNA による alphaTAT1 のロックダウン実験による

影響は見られなかったことから、alphaTAT1より上流のシグナル分子である可能性が示唆された。一方で、リチウム刺激で活性化する分子として報告のあるAC IIIの変化は見られなかった。

(5) 免疫組織化学的解析によって、成体ラット気管線毛細胞の線毛内に alphaTAT1 陽性反応が観察された。

以上の解析から、塩化リチウムは GSK-3beta の働きを抑制することで alphaTAT1 を活性化させ、微小管のアセチル化と線毛の伸長を促進する可能性が示唆された。また、線毛内に alphaTAT1 が局在していることから、線毛機能の維持などにも alphaTAT1 によるチューブリンアセチル化が関与すると予想された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Yamamoto T, Tsukahara T, Ishiguro T, Hagiwara H, Taira M, Takeda H (2015) The medaka dhc2 mutant reveals conserved and distinct mechanisms of Hedgehog signaling in teleosts. BMC Dev Biol. 15:9. doi: 10.1186/s12861-015-0057-x. 査読有
2. Nakakura T, Asano-Hoshino A, Suzuki T, Arisawa K, Tanaka H, Sekino Y, Kiuchi Y, Kawai K, Hagiwara H (2015) The elongation of primary cilia via the acetylation of  $\alpha$ -tubulin by the treatment with lithium chloride in human fibroblast KD cells. Med Mol Morphol. 48: 44-53. doi: 10.1007/s00795-014-0076-x. 査読有
3. Fujii H, Tamamori-Adachi M, Uchida K, Susa T, Nakakura T, Hagiwara H, Iizuka M, Okinaga H, Tanaka Y, Okazaki T (2014) Marked cortisol production by intracrine ACTH in GIP-treated cultured adrenal cells in which the GIP receptor was exogenously introduced. PLoS One, 9: e110543. doi: 10.1371/journal.pone.0110543. 査読有
4. Sato T, Iwano T, Kunii M, Matsuda S, Mizuguchi R, Jung Y, Hagiwara H, Yoshihara Y, Yuzaki M, Harada R, Harada A (2014) Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. J Cell Sci. 127:422-31. doi: 10.1242/jcs.136903. 査読有
5. 鈴木健史, 中倉敬, 萩原治夫 (2013) 哺乳動物細胞におけるチューブリンアセ

チル化酵素の細胞内局在動態の可視化. 札幌医科大学 医療人育成センター紀要 4: 11-15. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 中倉敬, 浅野 星野安信, 鈴木健史, 有澤謙二郎, 田中秀幸, 萩原治夫. 塩化リチウムによる一次線毛の伸長促進と $\alpha$ -チューブリンアセチル化の関与 ヒト繊維芽細胞を用いた解析. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、兵庫県神戸市 神戸国際会議場・展示場、2015年3月21-23日.
2. 田中秀幸, 中倉敬, 西島良美, 有澤謙二郎, 浅野 星野安信, 木内克子, 萩原治夫. 平滑筋ポドソーム形成におけるミオシン軽鎖キナーゼの形態的役割. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、兵庫県神戸市 神戸国際会議場・展示場、2015年3月21-23日.
3. 浅野 安信, 中倉敬, 有澤謙二郎, 八杉貞雄, 萩原治夫. ニワトリ卵巣形成におけるBmpシグナリングの役割. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、兵庫県神戸市 神戸国際会議場・展示場、2015年3月21-23日.
4. 田中秀幸, 萩原治夫. アラキドン酸による平滑筋ミオシン活性化機構の形態学的解析. 第46回日本臨床分子形態学会総会・学術集会。東京都新宿区 TKP市ヶ谷カンファレンスセンター、2014年10月17-18日
5. 田中秀幸, 萩原治夫. ラット骨格筋組織におけるカプサイシン (パニロイド) レセプター (VR1) の形態学的機能解析. 第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. 福岡県福岡市 アクロス福岡、2013年9月13-14日
6. 萩原治夫, 中倉敬, 浅野安信, 有澤謙二郎, 田中秀幸, 鈴木健史. 繊維芽細胞における一次線毛伸長について. 第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、福岡県福岡市 アクロス福岡、2013年9月13-14日
7. 中倉敬, 海野恵介, 曾田あずさ, 鈴木雅一, 萩原治夫, 田中滋康. ラット下垂体前葉副腎皮質刺激ホルモン産生細胞の増殖におけるIGFBP7の役割. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、香川県高松 サンポートホール高松・かがわ国際会議場、2013年3月28-30日

8. 田中秀幸、萩原治夫、平滑筋細胞におけるアクチン凝集構造体ポドゾームの形態学的機能解析、第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、香川県高松 サンポートホール高松・かがわ国際会議場、2013年3月28-30日

〔図書〕(計 1 件)

1. 萩原治夫、中倉敬、田中秀幸、西島良美、有澤謙二郎、浅野安信、木内克子、免疫組織化学の原理と基礎(組織細胞化学2015)、日本組織細胞化学会、2015(印刷中)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

萩原 治夫 (Haruo Hagiwara)  
帝京大学・医学部・教授  
研究者番号：80189464

### (2)研究分担者

鈴木 健史 (Takeshi Suzuki)  
札幌医科大学・医療人育成センター  
・准教授  
研究者番号：00261868

有澤 謙二郎 (Kenjiro Arisawa)  
帝京大学・医学部・助教  
研究者番号：40582846

浅野 安信 (Anshin Asano)  
帝京大学・医学部・講師

研究者番号：70459311

中倉 敬 (Takashi Nakakura)  
帝京大学・医学部・助教

研究者番号：60568658

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：