

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07931

研究課題名(和文) 哺乳動物細胞の繊毛小胞形成に介在する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of ciliary vesicle formation in mammalian cells

研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi, Tetsuo)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80433994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的なプロテオーム解析により、繊毛小胞形成に介在することが知られている Rab11と結合する候補タンパク質として新規GTP結合タンパク質Rab-like 3 (Rab13)を見出し、Rab11とRab13が結合することを示した。また、ヒト網膜上皮由来RPE1細胞においてRab13の細胞内局在を調べたところ、Rab13が中心小体に局在することを検出した。さらに、Rab13の発現抑制は一次繊毛形成率の低下を引き起こすことを示した。

研究成果の概要(英文)：By comprehensive proteome screen, we identified novel small GTPase Rab-like 3 (Rab13) as a putative binding partner of Rab11 which is involved in ciliary vesicle formation. We showed that Rab13 physically interacts with Rab11. We also found that Rab13 localizes to centrioles by immunofluorescence analysis in RPE1 cells. Furthermore, we observed that Rab13 depletion causes decrease of primary cilia formation in RPE1 cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 繊毛小胞

## 1. 研究開始当初の背景

殆ど全ての哺乳動物細胞に存在する非運動性繊毛 (一次繊毛: Primary cilia) は、受容器官 (センサー) として機能し、光、化学、機械刺激や Hedgehog, Wnt, PDGF などのシグナル分子を受容し細胞内へ伝達する。一次繊毛の構造・機能異常は、繊毛性疾患と呼ばれる多くの疾患を惹起し、その症状は嚢胞腎、網膜変性、内臓逆位、無臭覚、呼吸異常、不妊症、水頭症、肥満、糖尿病、高血圧、多指症など多岐に渡る。分裂期 (M 期) の紡錘体形成を担う中心小体 (Centriole) は、細胞が細胞周期を脱して G0 期に入ると、細胞膜近傍へ移動して基底小体 (Basal body) と成り、そこから細胞外方向へ微小管が伸展し一次繊毛が形成される。

中心小体が基底小体となる過程の初期段階に、繊毛小胞 (Ciliary Vesicle) と呼ばれる膜構造が形成されることが知られている。母中心小体 (Mother Centriole) の上部に接着して形成される繊毛小胞は、伸長する中心小体微小管を囲んで膨張し、最終的には一次繊毛の外膜 (繊毛膜: Ciliary Membrane) を形成すると考えられている。繊毛小胞形成過程においては、低分子量 G タンパク質 Rab11 により活性化されたグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) Rabin8 が低分子量 G タンパク質 Rab8 を GTP 型に変換し、活性化した Rab8 がエフェクターである Sec15 を介して繊毛小胞形成を促進するというモデルが想定されている。一方、申請者らは繊毛性疾患原因タンパク質である Talpid3, Cep290 が Rab8 の中心小体局在、及び繊毛小胞形成に必要であることを以前に示している。

## 2. 研究の目的

Rab11-Rabin8-Rab8-Sec15 経路 (以下、Rab カスケード) と Talpid3, Cep290 がどのように有機的に相互作用して繊毛小胞形成を制御するのか、またこれらの分子群と協調して働くタンパク質が存在するか、については不明なままである。そこで本研究では、細胞生物学的、生化学的手法を用いてこれらの問いを検証し、哺乳動物細胞における繊毛小胞形成に介在する分子メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

HEK293T 細胞を用いた過剰発現系により、上記のタンパク質と相互作用する分子を探索した。タンパク質間相互作用は、免疫沈降法、及び大腸菌から精製したりコンビナントタン

パク質を用いた *in vitro* 結合実験で調べた。各タンパク質の細胞内局在や動態については、免疫染色法で調べた。

## 4. 研究成果

網羅的なタンパク質相互作用解析から Rab11 と結合する候補タンパク質として、新規低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab-like 3 (Rab13) を同定した。

### (1) Rab13 は Rab11 と結合する

Rab13 と Rab11 の結合を調べるために、Flag タグを付加した Rab13 と GFP を付加した Rab11 を HEK293T 細胞に発現させ、抗 Flag 抗体、または抗 GFP を用いて免疫沈降実験を行った。その結果、どちらの抗体を用いて沈降した場合においても Flag-Rab13 と GFP-Rab11 の共沈降が観察された。次に、大腸菌発現系を用いて精製したりコンビナントタンパク質 Rab13、Rab11 を用いて結合実験を行ったところ、両者の共沈降が観察された。これらの結果から、Rab13 と Rab11 は相互作用することが示唆された。

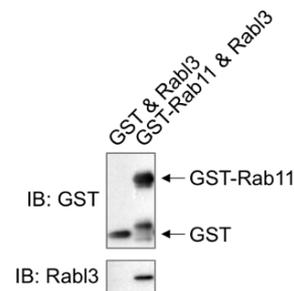


図1 Rab13とRab11は結合する

### (2) Rab13 は中心小体に局在する

Rab13 の細胞内局在を免疫染色法で調べた。その結果、ヒト網膜上皮由来 RPE1 細胞において Rab13 が中心小体に局在することがわかった。また、一次繊毛形成時においてもその局在に変化は見られなかった。

### (3) Rab13 は一次繊毛形成の初期段階に必要である

RPE1 細胞において Rab13 の発現抑制が一次繊毛形成に影響するか調べたところ、一次繊毛形成率の低下が観察された。次に、Rab13 が一次繊毛形成のどの段階に寄与するかを調べるために、一次繊毛形成時に中心小体から乖離することが知られている CP110 の動態を調べた。その結果、Rab13 発現抑制細胞では CP110 が中心小体から乖離せずに留まっていることがわかった。これらの結果から、Rab13 は一次繊毛形成の初期段階に必要

であることが示唆された。

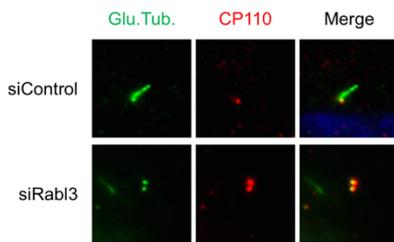


図2 Rab13の発現抑制は一次繊毛形成率を低下させる

#### (4) まとめ

以上の結果から、哺乳動物細胞において、Rab13は中心小体においてRab11と相互作用し、一次繊毛形成の初期段階に寄与することが示唆された。今後は、Rab13のノックアウト細胞を樹立し解析を行う予定である。

#### 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 4件)

1. 小林 哲夫、伊東 広  
がん細胞における一次繊毛消失メカニズム  
生化学 2018年4月号 Vol.92, No.2, 1-4 みに  
れびゅう 査読あり  
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900169

2. 小林 哲夫  
一次繊毛構築のはじまりの制御機構  
実験医学 2018年4月号 Vol.36, No.6, 921-925  
特集「一次繊毛の世界」 査読なし  
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758125062/index.html>

3. Kobayashi T, Itoh H.  
Loss of a primary cilium in PDAC  
*Cell Cycle* 16: 817-818 (2017) 査読なし  
DOI: 10.1080/15384101.2017.1304738

4. Kobayashi T, Nakazono K, Tokuda M, Mashima Y, Dynlacht BD, Itoh H.  
HDAC2 promotes loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma  
*EMBO Rep.* 18: 334-343 (2017) 査読あり  
DOI: 10.15252/embr.201541922

[学会発表] (計 7件)

1. 馬島 友、小林 哲夫、伊東 広  
膵管癌における一次繊毛消失メカニズムの解析  
第40回日本分子生物学会・第90回日本生化学会合同大会 ポスター発表 (2017年)

2. 小林 哲夫、馬島 友、庄田 彩乃、Brian David Dynlacht、伊東 広

膵管癌における一次繊毛消失機構の解析  
第69回日本細胞生物学会 ポスター発表  
(2017年)

3. Kobayashi T, Mashima Y, Shoda A, Dynlacht BD, Itoh H.  
Molecular mechanism of loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma  
Cold Spring Harbor Asia Meeting “Cilia and Centrosomes” Poster presentation (2017年)

4. 伊達山 泉、杉原 嘉洋、小林 哲夫、伊東 広  
セロトニン受容体 5HT6 の一次繊毛輸送機構の解析  
第39回日本分子生物学会 ポスター発表  
(2016年)

5. Kobayashi T, Nakazono K, Tokuda M, Mashima Y, Dynlacht BD, Itoh H.  
HDAC2 promotes loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma.  
The 28<sup>th</sup> CDB Meeting “Cilia and Centrosomes”.  
Poster presentation (2016年)

6. 小林 哲夫、中菌 昂亮、徳田 滯、馬島 友、Brian David Dynlacht、伊東 広  
膵管癌細胞における一次繊毛消失メカニズムの解析  
第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会 口頭発表 (2015年)

7. Dateyama I, Kobayashi T, Itoh H.  
Analysis of serotonin signaling mediated through primary cilia  
The 4th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences. Poster presentation (2015年)

[図書] (計 0件)

[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：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://bsw3.naist.jp/itoh/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi Tetsuo)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ  
エンス研究科・助教  
研究者番号：80433994