

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08523

研究課題名(和文) 基底小体と付随中心子の連結機構についての分子細胞生物学的研究

研究課題名(英文) Construction of the basal body-associated structures in cultured fibroblastic cells

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：一次線毛を伸長した基底小体には根小毛が付随し、基底小体と娘中心子はこれと同様の横紋を示す線維構造で連絡する。細胞分裂時の根小毛の動態、根小毛の構築制御機構、一次線毛形成におけるアセチル化酵素の動態について研究を行った。M期における複製中心子の移動時に、根小毛は小片化して消失する。根小毛小片化の分子機構について明らかにした。根小毛を構成するrootletinは細胞接着に関与し、C-Nap1の発現抑制により、根小毛が基底小体と無関係に形成されたことからC-Nap1以外の根小毛形成の核となる分子の存在が示唆された。CEP131は、微小管形成を制御してゴルジ装置の構築に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線毛は細胞表面の細胞突起で、線毛の機能的構造的異常は様々の線毛病の原因になる。線毛を伸長した基底小体には、基底小付属構造が付随し、線毛の機能維持と細胞内における線毛の固定に重要な役割を果たしている。今回の研究で、根小毛の動態、根小毛形成の制御因子について細胞生物学的に解明し、特に根小毛の分散化について新たな知見を得た。また中心体タンパク質には、ゴルジ装置の層板形成に関与することも解明した。これらの成果は生命科学の基礎知識を進歩させるとともに、線毛病の病態の解明にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：Striated rootlets extend from the basal body of primary cilia toward the cell nucleus. The basal body and its associated daughter centriole are connected by similar striated filamentous structures to each other. We investigated the dynamics of striated rootlets during cell division, the mechanism of controlling the construction of striated rootlets, and the dynamics of tubulin acetyltransferase in primary cilia formation. During the migration of the replicated centrioles, the striated rootlets were fragmented and then disappeared. The molecular mechanism of the fragmentation was studied. Rootletin, which constitutes the striated rootlets, was also involved in cell adhesion. By suppressing the expression of C-Nap1, striated rootlets were formed independently of the basal body, suggesting the existence of molecules other than C-Nap1 that are essential for striated rootlets formation. CEP131 was suggested to be involved in the construction of the Golgi apparatus.

研究分野：機能形態学

キーワード：根小毛 基底小体 基底小体付属構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1).線毛は細胞表面の細長い突起で、細胞膜とアクソネーム微小管から構成される。アクソネーム微小管のチューブリン分子はアセチル化修飾を受け、構造的に安定化している。線毛は中心子と同じ構造の基底小体から伸長し、基底小体には根小毛(ルートレット)、根小足、翼状板という基底小体付属構造が付随し、これらの基底小体付属構造は細胞内における基底小体の固定に重要な役割を果たし、線毛装置の機械的支持基盤として機能している。根小毛は、基底小体から細胞深部に向かう線維構造の束で、規則正しく配列したルートレチンから形成される。基底小体へのルートレチンの局在には C-Nap1 が関与し、さらに C-Nap1 の基底小体への局在には CEP135 が関与する。ルートレチンと C-Nap1 の結合は、Nek2 に依存した C-Nap1 のリン酸化により阻害される。

(2).G0 期の細胞では、線毛細胞でなくてもペアの中心子の母中心子から線毛が伸長し、線毛を伸長した母中心子、すなわち基底小体と娘中心子は、根小毛と同様の横紋を有する線維構造で連結している。私どもはこのような構造を striated connector と報告した。中心体のリンカー、すなわち基底小体あるいは母中心子と娘中心子を相互につなぎとめる機構についてはほとんど解明されていない。根小毛はルートレチンにより形成されるが、根小毛の構造を安定化する機構についても十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

一次線毛を伸長した基底小体の近位端からは横紋を示す線維構造の束が伸長し、根小毛と呼ばれる。基底小体すなわち母中心子と娘中心子も同様の横紋を有する線維構造の束によって連結し、これらの線維構造はルートレチンによって形成される。ルートレチンと相互作用する分子を探求して中心子相互の連結機構を解明するとともに、ルートレチンと相互作用することが知られている分子について細胞周期性の動態を追及し、またそれら分子の発現抑制実験により、ルートレット形成および一次線毛形成における役割について解明することを目的とした。また、チューブリンアセチル化酵素の ATAT1 の発現動態の解明も目的とした。

### 3. 研究の方法

(1).一次線毛を伸長する KD 細胞を用いて、ルートレットの動態および ATAT1 の発現について免疫組織化学的に解析した。抗体として、R67 抗体、およびルートレチン、各種チューブリン、CEP (中心体タンパク質)、C-Nap1、ATAT1 に対する抗体を用いた。

(2).中心体領域に存在する分子をターゲットにして、ルートレットに局在する新規の分子について多重染色法による免疫組織化学により追及した。免疫組織化学の結果から得られた候補分子について、siRNA 法による発現抑制実験、ウエスタンブロット法による発現解析実験を行った。

(3).ルートレチン、C-Nap1、CEP131 の機能について、siRNA を用いた発現抑制実験により解析した。遺伝子発現抑制を PCR 法で確認し、ノックダウン群とコントロール群について、一次線毛形成の有無、線毛の長さ、ルートレットの形態変化、細胞の形態変化、ゴルジ装置の形態変化について免疫組織化学的および統計学的に解析した。

### 4. 研究成果

(1). 細胞分裂期におけるルートレットの動態について明らかにした。ルートレットは、複製中心子の分離・移動時に、C-Nap1 とともに複製中心子から断片化して分離し、ついで消失した。小片化したルートレットには CEP68 のシグナルが陽性で、正常構造を保った状態で断片化することを明らかにした。CEP135 は小片化したルートレットには局在せず、Nek2 は、ルートレットの断片化に先立って基底小体と娘中心子に発現するが、小片化したルートレットには局在しなかった。ルートレチンと C-Nap1 は、リン酸化により中心子との結合能力及び相互の結合能力が低下することによって中心子から分離すると考えられていたが、結合を保った状態で中心子から分離することを明らかにした。

. ATAT1 の細胞周期性の発現動態を明らかにした。ATAT1 は、中心子、基底小体、核、chromatid、midbody に局在し、チューブリンのアセチル化に加え、RNA 転写、微小管の分配、細胞質分裂に関与することが示唆された。

(2)CEP 関連分子、BBS 関連分子、細胞骨格構成分子など約 50 種類のタンパク質分子について解析したところ、ARL13A がルートレットに局在することが疑われた。ARL13A の siRNA 実験では、免疫組織化学的に ARL13A に対する抗体反応に変化がみられなかったことから、使用し

た抗体による擬陽性の可能性が高く、ARL13A のルートレットへの局在については証明できなかった。あるいは ARL13A と共通の抗原部位を有する分子の存在も示唆されるが、解明に至らなかった。

(3). siRNA による発現抑制実験によりルートレチンの機能を明らかにした。ルートレチンの発現抑制により、基底小体と娘中心子への C-Nap1 発現が低下し、C-Nap1 の基底小体と娘中心子への局在維持にルートレチンが関与することが示唆された。ルートレチンの発現抑制により一次線毛の出現率に変化はなかったが、線毛のねじれ、階段状の屈曲、線毛先端部の球状化など、多くの一次線毛に形態異常が見られた。ルートレチンの発現抑制により、細胞の接着能が低下し、細胞中心部がドーム状にもりあがったことによる細胞質内の機械的圧迫が、異常線毛形成の一因と考えられた。

(4). siRNA による発現抑制実験により C-Nap1 の機能を明らかにした。C-Nap1 の発現抑制により、基底小体や中心子に連絡しない多数のルートレットが形成され、ルートレチンの発現量も増加した。これらの線維構造には CEP68 が局在し、正常の分子構築からなるルートレットであることが示された。ルートレットが基底小体から独立して形成されたことから、ルートレット形成の核となる C-Nap1 以外の分子の存在が示唆された。C-Nap1 の発現抑制により、一次線毛の出現率に変化はなかったが、線毛の長さはノックダウン群で  $3.09 \pm 0.86\text{mm}$ 、対照群で  $4.47 \pm 0.87\text{mm}$  と優位に短くなった。さらに基底小体と娘中心子間の距離はノックダウン群で  $1.28 \pm 0.68\text{mm}$ 、対照群で  $0.56 \pm 0.16\text{mm}$  と有意に増加し、両者間のルートレチン発現は不明瞭だった。基底小体(母中心子)と娘中心子の連結には C-Nap1 が関与することが改めて示された。

(5). siRNA による発現抑制実験により CEP131 の機能を明らかにした。CEP131 は中心体と中心体を取り巻いて顆粒状に存在し、これらはゴルジ装置の局在部位と重なっていた。CEP131 の発現抑制により、ルートレットの形態に直接的な効果はなかったが、ゴルジ装置は断片化して層板構造の構築が障害された。さらに ATAT1 の発現量が低下し、CEP131 は微小管の安定化とゴルジ装置の層板構築に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nekooki-Machida Y, Nakakura T, Nishijima Y, Tanaka H, Arisawa K, Kiuchi Y, Miyashita T, Hagiwara H.	4. 巻 51
2. 論文標題 Dynamic localization of $\alpha$ -tubulin acetyltransferase ATAT1 through the cell cycle in human fibroblastic KD cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 217, 226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-018-0195-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nekooki-Machida Y, Hagiwara H	4. 巻 53
2. 論文標題 Role of tubulin acetylation in cellular functions and diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 191, 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-020-00260-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 萩原治夫
2. 発表標題 基底小体に付随するstriated rootletの構築と消失について
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruo Hagiwara, Yoko Nekooki, Toshio Miyashita, Takashi Nakakura
2. 発表標題 Cyclic changes of the organization of striated rootlets and the localization of $\alpha$ -tubulin N-acetyltransferase (ATAT1) in fibroblastic KD cells.
3. 学会等名 The 19th congress of the international federation of associations of anatomists (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原治夫
2. 発表標題 一次線毛を伸長した基底小体に付随するstriated rootletの断片化びについて
3. 学会等名 第50回日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 猫沖陽子、萩原治夫	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 350のうちの13
3. 書名 卵管の発生と解剖 In 実践解剖学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	有澤 謙二郎 (ARISAWA Kenjiro) (40582846)	帝京大学・医学部・講師  (32643)	
研究分担者	田中 秀幸 (TANAKA Hideyuki) (70343085)	帝京大学・医学部・講師  (32643)	
研究分担者	宮下 俊雄 (MIYASHITYA Toshio) (80415314)	帝京大学・医学部・講師  (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------