

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05434

研究課題名(和文) 一次繊毛におけるABCタンパク質の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of ABC proteins in primary cilia

研究代表者

永田 紅 (NAGATA, Koh)

京都大学・農学研究科・研究員

研究者番号：70401213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一次繊毛(primary cilia)は、ほとんどの哺乳動物細胞に存在するアンテナ様のオルガネラであり、外部環境を感知して細胞内へ情報を伝える。細胞の膜の脂質組成や分布は一次繊毛の形成や機能に関わるが、その制御機構については不明な点が多い。本研究では、コレステロールなどの膜脂質動態に関わるABCタンパク質に注目した解析を行い、ABCA1ノックダウン細胞において一次繊毛形成が抑制されること、一次繊毛先端にコレステロールが蓄積していること、ABCB4が一次繊毛の軸系あるいは先端に局在することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次繊毛の形成異常や機能不全は、網膜色素変性、多発性嚢胞腎、内臓逆位など多様な症状を呈する「繊毛病」を引き起こす。膜の脂質組成や分布は一次繊毛の形成や機能に関わるが、その制御機構については不明な点が多い。本研究において、ABCA1やABCB4などのABCタンパク質による時空間的な膜脂質制御が一次繊毛の形成や機能を調節する可能性が示唆されたことは、繊毛病の病因や病態の解明に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia are antenna-like organelles found on the surface of most mammalian cells, which sense the extracellular environment and convey signaling information to the cell. Membrane lipid composition and distribution are involved in the formation and function of primary cilia. However, its regulatory mechanism remains unclear. In the present study, we focused on ABC proteins which are involved in the membrane lipid dynamics. We found that the formation of primary cilia was suppressed in ABCA1 knockdown cells. We observed that cholesterol was enriched at the tip of cilium, and ABCB4 was localized on the ciliary membrane, sometimes at the tip of the cilium. Our results suggest the contribution of ABC proteins in the formation and function of primary cilia.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 ABCタンパク質 ABCA1 ABCB4 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

一次繊毛 (primary cilia) は、ほとんどの哺乳動物細胞に存在する細胞膜の突起構造であり、外部環境を感知して細胞内部に情報を伝達するオルガネラである (図1)。一次繊毛の形成異常や機能不全は、網膜色素変性、多発性嚢胞腎、内臓逆位など多様な症状を呈する「繊毛病」を引き起こすことから、その形成機構や機能の解明は臨床的にも重要な課題である。

一次繊毛は細胞膜が突出した長さ数 μm の構造であり、その膜には多くの受容体やチャネルが存在する。一次繊毛膜と細胞体の細胞膜との間には障壁が存在し、両者のタンパク質や脂質組成は異なる。また、一次繊毛膜上においても、その先端・軸糸・根元ではタンパク質や脂質の組成が異なる。一次繊毛に局在するタンパク質の輸送については研究が進められている一方で、一次繊毛膜の脂質分布制御機構についてはまだ分かっていないことが多い。

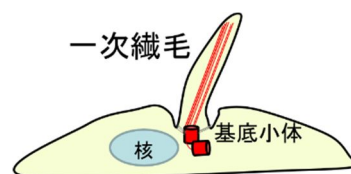


図1 一次繊毛は細胞の外部環境を感受して伝えるアンテナである。

近年、一次繊毛膜のホスファチジルイノシトールの組成・分布が変化することによって一次繊毛の先端が干切れ、細胞外へ放出されること、この現象が一次繊毛の解体と細胞分裂のトリガーとなることが報告された (*Cell* 168:264-279, 2017)。このことから、他の脂質、例えば一次繊毛の Sonic hedgehog (Shh) シグナリングにおいても重要な働きをはたすコレステロールなども、時空間的に制御を受けて変化する可能性が示唆された。

そこで我々は、膜脂質動態に関わる ABC (ATP-binding cassette) タンパク質に注目した解析を行うことにした。ヒトで 48 種類が知られる ABC タンパク質の多くは、ATP 加水分解依存的に、抗がん剤などの生体異物や代謝産物、過剰なコレステロールを排出するトランスポーターとして機能する。また、脂質二重層の内葉から外葉へとコレステロールやリン脂質をひっくり返すフロッパーゼとしての機能を有するものもあり、生体膜の脂質組成・分布やマイクロドメインの制御に関わることが知られている (図2)。

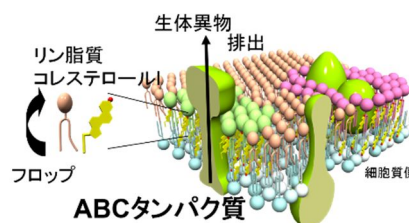


図2 ABC タンパク質は生体異物や過剰なコレステロールを細胞外へ排出したり、膜脂質を内葉から外葉へフロップしたりする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ABC タンパク質による一次繊毛の形成や機能の制御機構を明らかにすることである。さらには、種々の繊毛病の病因解明、予防、治療に寄与することを目指す。

3. 研究の方法

ブタ近位尿細管由来の LLC-PK1 細胞やマウス胎児繊維芽細胞 (MEF)、ラット腎臓内部髄質集合管 (IMCD) 細胞を用い、膜脂質動態に関わる ABC タンパク質を発現させたりノックダウンしたりすることで、ABC タンパク質が一次繊毛形成に与える影響を検討した。また、それら ABC タンパク質の細胞内局在性を検討した。

4. 研究成果

(1) 一次繊毛膜外葉におけるコレステロールの解析

LLC-PK1 細胞を血清飢餓状態で培養し、一次繊毛を形成させた。コレステロール濃度の高い膜に結合するコレステロールプローブである、ウェルシュ菌産生毒素由来 D4 と EGFP との融合タンパク質を大腸菌において発現精製し、細胞外液に添加して細胞膜外葉のコレステロールを検出した。その結果、一次繊毛の先端の外葉にコレステロールが濃縮している様子を観察した。

(2) ABCA1 ノックダウン細胞を用いた解析

ABCA1 は、ATP 加水分解依存的に細胞内の過剰コレステロールやリン脂質を細胞外の脂質受容体 apoA-I へ受け渡し、善玉コレステロールとして知られる HDL (high-density lipoprotein) を産生するのに必須の膜タンパク質である。また、ABCA1 は脂質のトランスポーターとしてだけでなく、apoA-I 非存在下でも細胞膜のコレステロールを内葉から外葉へとフロップするフロッパーゼとしても機能する。

ABCA1 が一次繊毛の形成に関与するかどうかを調べるため、ABCA1 を内在的に発現しているマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を用い、ABCA1 発現抑制 MEF と ABCA1 再発現 MEF 細胞株を樹立した。細胞を血清飢餓条件で培養して一次繊毛形成条件においたところ、コントロール細胞における一次繊毛形成率が 67.1% であったのに対し、ABCA1 発現抑制 MEF では 45.2% であった(減少率約 33%)。発現抑制 MEF に ABCA1 を再発現させると、形成率は 61.4% となり、コントロール細胞の約 92% にまで回復した(図 3)。よって、MEF において、内在性の ABCA1 は一次繊毛形成を促進する、あるいは一次繊毛分解を抑制することが示唆された。ABCA1 の細胞内局在性の観察から、ABCA1 は細胞全体の脂質組成・分布を制御することで、一次繊毛形成に関わることが示唆された。これまでに、コレステロール輸送能をもつ ABC タンパク質に注目して一次繊毛形成を評価した報告はなく、本研究において ABCA1 が一次繊毛の形成促進あるいは分解抑制に関わることをはじめて見出したことは意義深い。

一方、一次繊毛研究によく用いられるラット腎臓内部髄質集合管 (IMCD) 細胞において内在性 ABCA1 は発現しておらず、IMCD 細胞の一次繊毛形成・維持に ABCA1 は関与していなかった。

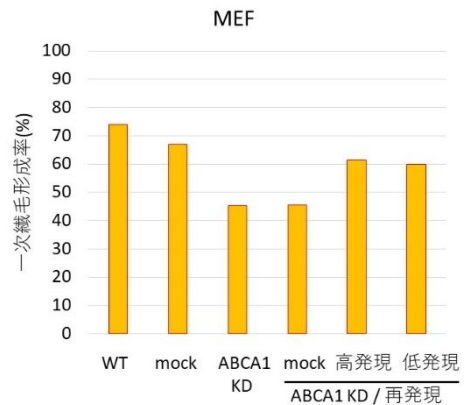


図 3 ABCA1 ノックダウン (ABCA1 KD) 細胞において一次繊毛の形成率が低下し、ABCA1 の再発現により形成率は回復した。

(3) ABCB4 の局在性の解析

LLC-PK1 細胞において、膜脂質動態に関与する複数の ABC タンパク質の局在性を検討したところ、コレステロールの排出やホスファチジルエタノールアミンのフロップに関与する ABCB4 が一次繊毛の軸系あるいは先端に局在する様子が観察された。とくに先端への局在性が特徴的であり、ときには一次繊毛の先端で風船状に膨らんだ膜の上に ABCB4 が観察されることもあった(図 4)。これらの結果から、ABCB4 は一次繊毛膜上で局所

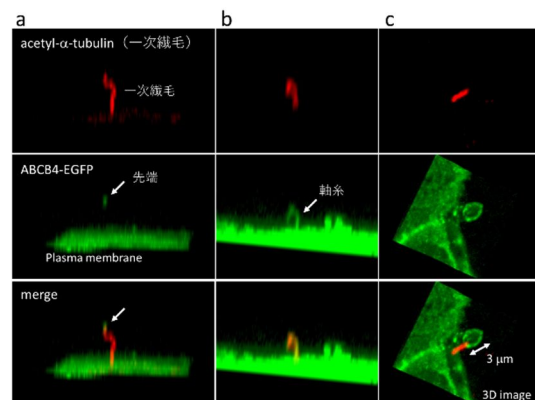


図 4 LLC-PK1 細胞において、ABCB4 は細胞膜のほか、一次繊毛の先端 (a) や軸系 (b) に局在した。また、一次繊毛の先端で風船状に膨らんだ膜上に観察されることもあった (c)。

的にコレステロールやリン脂質を動かすことで一次繊毛の機能に関与する可能性が示唆された。

本研究において、細胞膜の変形を伴うイベントで ABC タンパク質が時空間的に適切に機能する重要性を示唆したことは、細胞生物学的のみならず臨床的にも意義深いと考えられる。

さらに、一次繊毛の形成に必要な Rab8 や F-BAR ドメインタンパク質 PACSIN2 が、細胞内の管状膜構造の形成にも関わることから、本研究は細胞内管状膜構造の機能解析へと展開しつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田 紅、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 管状膜構造に局在するMRP6 (ABCC6) の解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永田 紅
2. 発表標題 1分子イメージングから見えてくるABCタンパク質の機能
3. 学会等名 生理化学研究ユニット第10回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田紅
2. 発表標題 膜脂質動態に関わるABCタンパク質の1分子イメージングと機能解析
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田紅、植田和光
2. 発表標題 ABCC6 (MRP6) の局在する細胞膜陥入管状構造の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡本雄介、永田紅、笠井倫志、木村泰久、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 ABCAサブファミリータンパク質のC末端領域の機能解明を目的としたキメラタンパク質の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永田紅、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 MRP6 (ABCC6) が細胞内管状膜構造に局在する意味
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田紅、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 MRP6(ABCC6)の局在する細胞内管状膜構造の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------