

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16105

研究課題名（和文）ホスホリパーゼC による一次線毛退縮制御機構の解明

研究課題名（英文）Analyses of the role of phospholipase C epsilon in the primary cilia disassembly

研究代表者

稲葉 弘哲（Inaba, Hironori）

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80791334

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）：本研究では、ホスホリパーゼC（PLC）の一次線毛退縮における機能解析を通じて、増殖シグナルによる一次線毛が退縮する分子機構の全容解明を目指した。PLCは血清中のリゾホスファチジン酸（LPA）により活性化され、カルシウムオシレーションを起こすことが明らかとなった。また、AktやMAPKなどの増殖シグナルの持続的活性化もPLCが担っていることが分かった。カルシウムイオノフォアによる持続的なカルシウムシグナルは一次線毛を退縮させることに十分であり、PLCは受容体直下でこの機能を果たすと考えられた。今後、カルシウムシグナルの標的基質について検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次線毛は、細胞静止期に形成される微小管を骨格としたアンテナ様の構造物で、細胞の増殖や分化・極性などを制御している。細胞が増殖シグナルを受容した際に一次線毛が退縮することは、正常な細胞周期の進行において重要である。

しかし、その形成に関わる分子機構に比べ、退縮の分子機構は多くが未解明である。退縮におけるカルシウムシグナルの重要性はこれまで示唆されていたが、カルシウムオシレーションについては報告されておらず、今回初めて明らかとなった。その生理的な意義については今後さらなる研究が必要である。また、PLCは一次線毛の退縮と同時に細胞の増殖も制御している可能性があり、今後検討したい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanism of primary cilia disassembly induced by proliferation signals through analyzing the function of phospholipase C (PLC). PLC was activated by lysophosphatidic acid (LPA) in serum and induced calcium oscillation. PLC was also responsible for the sustained activation of proliferation signals such as Akt and MAPK. Because sustained calcium signaling by calcium ionophores was sufficient to disassemble primary cilia, PLC was suggested to play a role in this function downstream of the receptor. Further studies are required to identify the substrates for calcium signaling.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次線毛 PLC カルシウムシグナル 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

中心体は間期には核近傍に局在するが、細胞周期静止期 (G0 期) には細胞膜直下に移行し、微小管を骨格とした突起状の一次線毛を形成する。一次線毛には様々な受容体が高密度で局在し、水流などの物理的刺激や、成長因子などの化学的刺激を受容し、細胞の増殖・分化・極性を制御している。一次線毛の形成・機能不全は多発性嚢胞腎や網膜色素変性症、多指症などの線毛病を引き起こすことが知られており、近年では癌との関連についても注目されている。

我々は、細胞増殖期に一次線毛形成を抑制する分子機序の一端を解明し、この機構の破綻は予定外の一次線毛形成を誘引し、細胞周期進行を妨げることを明らかにしてきた (Inaba et al., *J Cell Biol*, 2016; Goto et al., *Cell Mol Life Sci*, 2017)。近年、G0 期の細胞が増殖刺激を受容した際に一次線毛の退縮を担う因子も多数同定され、同時に、一次線毛が正常に退縮しないことも、細胞周期進行を妨げることが示された。この様に、一次線毛が細胞周期の適切な時期に形成・退縮することが適切な細胞周期進行に必須であることが分かってきた。

しかし、一次線毛の退縮制御因子は多数同定されたものの、①細胞外からの増殖シグナルがどのように細胞内シグナルに変換され、線毛退縮装置が活性化されるか、②細胞体ではなく、一次線毛が外部環境を感知することが適切な細胞増殖に真に必須であるか、といった多くの重要な疑問が残っていた。

研究開始時までには我々は、ヒト網膜色素上皮細胞(RPE-1)においてホスホリパーゼ C (PLC) ϵ が成長因子 (血清) による一次線毛退縮に必須な因子であることを同定していた。PLC は主にホスフォチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP2)を基質とし、セカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5-三リン酸(IP3)とジアシルグリセロール(DAG)へと分解する酵素で、PIP2 の低下や IP3 と DAG の生成は様々な細胞内応答を引き起こす。PLC は構造的に 6 つのタイプに分類され、それぞれ活性を制御する上流因子が異なる。PLC ϵ は低分子量 G タンパク質 (Rho, Ras, Rap1) や、三量体 G 蛋白質の G $\beta\gamma$ によって活性化されるため、増殖刺激の情報伝達分子として極めて重要な役割を担っていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、一次線毛退縮における PLC ϵ の機能解析を通じ、成長因子受容体から一次線毛退縮装置への情報伝達機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PLC ϵ は普遍的な一次線毛退縮制御因子であるかの検討

- 一次線毛の制御機構は細胞種によって異なることが示唆されていた。RPE-1 以外の細胞 (マウス線維芽細胞 NIH3T3 や、マウス腎臓集合管由来細胞株 IMCD3) においても成長因子による細胞周期への再進入時の一次線毛退縮に PLC ϵ が必須であるかを RNA 干渉法により解析した。
- マウス PLC ϵ を誘導発現できる RPE-1 細胞株を樹立し (tet-On RPE1 3 \times FLAG-msPLC ϵ)、Doxycycline の添加によって一次線毛の表現型を相補できるかを検討した。
- PLC ϵ を KD すると、一次線毛が退縮しないことに加え、細胞周期の進行も抑制された。これが、一次線毛退縮不全によるものか、PLC ϵ が細胞周期の進行にも影響を及ぼすかを明らかにするため、一次線毛形成に必須な IFT20 のノックアウト細胞の作製を試みた。

(2) 一次線毛退縮における PLC ϵ 上流シグナル経路の解明

- 血清には様々な成長因子が含まれる。研究開始後に Hu らによって、リゾホスファチジン酸 (LPA) が一次線毛を退縮させることが報告された (Hu et al., *Nat Commun*, 2021)。そこで、LPA による一次線毛退縮に PLC ϵ が関与しているかについて、RNA 干渉法によって解析した。
- LPA 受容体から PLC ϵ が活性化される経路として、RhoA および G $\beta\gamma$ が候補として考えられた。それぞれの阻害剤を用い、一次線毛退縮への影響を解析するとともに、PLC ϵ の活性について、カルシウムイメージングによって評価した。

(3) 一次線毛退縮における PLC ϵ 下流シグナル経路の解明

Hu らは、LPA の下流で Hippo 経路による Aurora A の発現亢進と、Ca²⁺ による Aurora A のリン酸化が、一次線毛の退縮へと導くと主張している (Hu et al., *Nat Commun*, 2021)。一次線毛退縮へのカルシウムシグナルと、Aurora A の関与については以前から報告されていた。しかし、LPA を受容した際に一過性に Ca²⁺ が上昇することと、Aurora A の発現が上昇してくる時期とは矛盾が生じているように考えた。そこで、Ca²⁺ 指示薬 Fluo-8 を用いて、血清飢餓 48 時間後に LPA を加え、細胞内 Ca²⁺ の変動を 2 時間に渡ってライブイメージングした。この際の Ca²⁺ 変動が PLC ϵ

の欠損によって変化するかについても検討した。

Aurora A の関与については、野生型、恒常活性型といわれる T288D 変異株、ドミナントネガティブ変異 T288A をそれぞれ誘導発現できる Tet-On RPE-1 細胞株を樹立して検討した。

また、PLC ϵ が増殖シグナルにも関与していることを考え、Akt や Erk1/2 のリン酸化について経時的な変化をウエスタンブロッティングにて解析した。

4. 研究成果

(1)

NIH3T3 細胞、mIMCD3 細胞において、3 種類の siRNA 配列を用い、ノックダウン(KD)し、血清飢餓 48 時間後に 10% FBS を添加し、0 時間後、24 時間後の一次線毛形成率を測定した。しかし、これらの細胞ではいずれにおいても PLC ϵ の KD による一次線毛退縮への影響は認められなかった。

RPE-1 細胞においては、Doxycycline による 3×FLAG-msPLC ϵ の発現によって部分的に PLC ϵ KD による一次線毛の表現型を相補することができた。

IFT20 の KO 細胞株の樹立を目指したが、研究期間中には樹立できなかった。また、shRNA による安定的な IFT20 KD 細胞株を樹立したが、線毛を形成している細胞が多く、ノックダウン効率が不十分であると考えられた。

(2)

RPE-1 細胞において、LPA による一次線毛の退縮も PLC ϵ を KD すると阻害されることが分かった(図 1)。また、血清では表現型のみられなかった NIH3T3 細胞においても、LPA 刺激による一次線毛退縮は PLC ϵ の KD によって阻害された。

RhoA の阻害剤として Rho inhibitor I (Cytoskeleton inc.)、G β γ の阻害剤として Gallein をそれぞれ用い、血清飢餓の RPE-1 細胞に LPA を加えた直後の細胞内カルシウム濃度変化を経時的に観察したが、それぞれ単独、あるいは両方を加えても、Ca²⁺オシレーションは消失しなかった。Gallein は G β γ と PI3K との結合を阻害する薬剤であり、G β γ から PLC ϵ への経路は阻害できない可能性もある。あるいは、他の経路によって PLC ϵ が活性化されているかもしれない。

一方で、一次線毛退縮へのこれらの薬剤の影響を検討したところ、Gallein は影響がみられなかったが、Rho inhibitor I では血清による一次線毛の退縮がみられなかった。しかし、Rho の下流である Rho kinase の阻害剤 Y-27632 によっても一次線毛の退縮がみられなかったため、これは RhoA によって直接制御される PLC ϵ とは別経路の影響と考えられる。

(3)

血清飢餓 48 時間後の RPE-1 細胞に 2 μ M の LPA を加え、Ca²⁺イメージングを行ったところ、添加直後のカルシウム応答に加えて、Ca²⁺オシレーションが観察された(図 2：青線)。これは、観察した 2 時間に渡って持続していた。PLC ϵ を KD したところ、LPA 添加直後の Ca²⁺応答は観察されたが、Ca²⁺オシレーションが消失した(図 2：赤線)。このことから、PLC ϵ は持続的なカルシウムシグナルの活性化に寄与することが示唆された。

カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンによっても一次線毛が退縮することが報告されていることから、この持続的なカルシウムシグナルの活性化が一次線毛の退縮に寄与していると考えられる。

Doxycycline による myc-AurA WT, T288D, T288A の誘導発現はいずれも PLC ϵ KD による一次線毛の表現型を相補しなかった。T288D は恒常活性型として報告されている論文もあるが、実際に恒常活性型として機能するかについては疑問が残る。

LPA 刺激によって Akt と Erk1/2 のリン酸化はいずれも 2 時間以上に渡って認められた。一方で、PLC ϵ を KD すると、15 分程度の短時間ではリン酸化がコントロール同様にみられたが、持

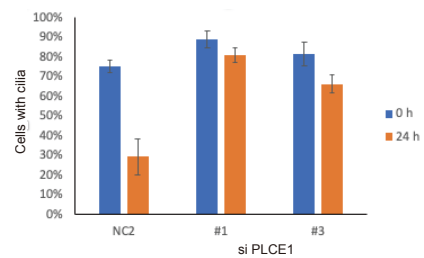


図 1 : RPE-1 細胞において PLC ϵ を KD すると、LPA 添加後の一次線毛の退縮が抑制された。

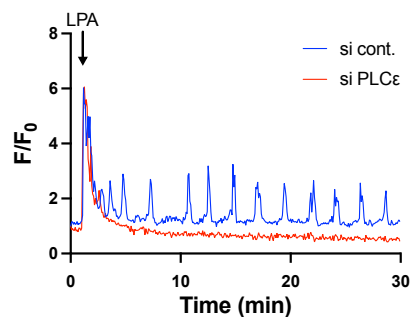


図 2 : 増殖刺激による Ca²⁺オシレーションは PLC ϵ 依存的である。

持続的なリン酸化が消失した (図 3)。このように PLC ϵ は持続的な増殖シグナルの活性化に必要であることが示唆された。

以上のように、本研究によって PLC ϵ は LPA による一次線毛退縮において、持続的なシグナルの活性化に重要な機能を有することが示唆された。今後、上流のシグナルや、カルモジュリン-Aurora A 経路との関係についてより詳細な解析が必要である。

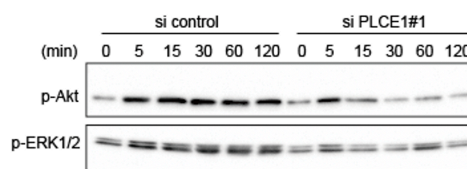


図 3 : 血清飢餓 48 時間後、2 μ M LPA を添加後のタイムコース。PLC ϵ は持続的な Akt や Erk の活性化に必要である。

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 2件）

1. 著者名 Inaba Hironori, Miao Qianqian, Nakata Takao	4. 巻 296
2. 論文標題 Optogenetic control of small GTPases reveals RhoA mediates intracellular calcium signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100290 ~ 100290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 稲葉弘哲, 中田隆夫	4. 巻 56
2. 論文標題 低分子量G蛋白質の光遺伝学による操作と細胞内機能の観察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 59 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.56.2_59	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 稲葉弘哲, 中田隆夫
2. 発表標題 光遺伝学を用いた低分子量Gタンパク質によるPLC 活性制御機構の解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hironori Inaba, Qianqian Miao, Takao Nakata.
2. 発表標題 Optogenetic control of small GTPases reveals RhoA-mediated intracellular calcium signaling.
3. 学会等名 Cell Bio Virtual 2020 - An Online ASCB/EMBO Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲葉弘哲、 ミャオセイセイ、 中田隆夫
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質の光遺伝学的制御により明らかとなったRhoAによる細胞内カルシウムシグナル制御
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qianqian Miao, 稲葉弘哲, 中田隆夫
2. 発表標題 光遺伝学によるRhoA/Rac1クロストークの時空間解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
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