

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860044

研究課題名(和文) 一次繊毛の膜輸送に関する新規遺伝子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel genes involved in a primary cilium.

研究代表者

加藤 洋平 (Kato, Yohei)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90568172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新規の繊毛関連遺伝子を同定しその機能を解析することで、繊毛の異常に起因する疾患の分子メカニズムの解明を目指した。新規の繊毛関連遺伝子の候補として低分子量GTPaseのRab-Likeファミリー(RabL2-RabL5)に着目した。これらの遺伝子をクローニングし実験を行った結果、RabL2がCentrosomal protein 19k Da (Cep19)と複合体を形成し、繊毛基部の基底小体に局在することを見出した。これらの結果といくつかの論文の情報から、RabL2-Cep19複合体は精子の鞭毛運動に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rab-Like 2 (RabL2) protein belongs to the Ras superfamily of small GTPases. Although functions of RabL2 are unclear, the RabL2 gene is conserved in species that have motile cilia/flagella, and it was reported that the expression level of RabL2 is higher in ciliated cells than in non-ciliated ones. Moreover, male mice carrying a RabL2 mutation were reported to be sterile as a consequence of severely compromised sperm motility. Therefore, it is possible that RabL2 is implicated in functions of cilia/flagella.

In this study, we found that RabL2 binds to Cep19 in both GTP- and GDP-bound states, and the two proteins are co-localized on the centrosome and the basal body. Furthermore, we demonstrated that Cep19 recruits RabL2 to the centrosome. On the basis of these data, we propose a model in which RabL2 and Cep19 form a complex not only at the centrosome but also at the basal body, where they function together in ciliary motility.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：一次繊毛 鞭毛 中心体 基底小体 低分子量GTPase Rab Like

1. 研究開始当初の背景

ほとんどのヒトの細胞は繊毛と呼ばれる細胞小器官を有している。繊毛は運動性繊毛と非運動性繊毛の二つに大別される。運動性繊毛(鞭毛)を持つ細胞の例として精子があげられる。精子は鞭毛の運動によって卵子まで到達し受精する。鞭毛運動に異常がある場合は不妊になることが多いので、鞭毛運動の研究は昔から重要視されている。一方、非運動性繊毛(一次繊毛)は細胞に普遍的に存在する構造ではあるが、進化的な痕跡器官であり、重要な働きは持っていないと長い間考えられていた。ところが最近になって、一次繊毛が化学的シグナル、光刺激、機械刺激など、さまざまなシグナルを感知する細胞のアンテナとしての働きを持っていることが明らかになってきた。一次繊毛の異常は、嚢胞腎、網膜変性、内臓逆位、多指症、病的肥満、精神遅滞など、さまざまな疾患の原因になることが報告されており、これらは総称して「繊毛病」と呼ばれている。最近のプロテオーム解析の結果から、繊毛にはおよそ 1000 種類ものタンパク質が存在することが判明しているが、それら多くのタンパク質がどのような働きを担っているのかほとんどわかっていない。そのため、繊毛に関係する遺伝子を同定し、その働きを解明することは基礎生物学においてだけでなく医学的にも非常に重要である。

2. 研究の目的

(1) 新規の繊毛関連遺伝子の同定と機能解析

本研究では新規の繊毛関連遺伝子を同定しその機能を解析することで、繊毛の異常に起因する疾患の分子メカニズムの解明を目指した。新規の繊毛関連遺伝子の候補として、低分子量 GTPase に属する Rab-Like ファミリー(RabL2-RabL5)に着目した。Rab-Like ファミリーは繊毛の形成時に発現が上昇することや、繊毛・鞭毛を持つ生物種で保存されていることなどから、新規の繊毛関連遺伝子ではないかと予想した。これらの遺伝子についてこれまでにほとんど研究がなされていなかったため、まずは遺伝子をクローニングするところから研究を開始し、以下の項目を明らかにするための実験をおこなった。

培養細胞における細胞内局在(繊毛や中心体に局在するかどうか)

結合タンパク質の探索と同定(繊毛関連タンパク質との相互作用があるか)

繊毛形成との関係(Rab-Like の変異体、結合タンパク質の変異体を発現させる、または遺伝子発現を抑制することで繊毛に異常が生じるか)

(2) バルデー・ビードル症候群(BBS)の原因となる BBSome 複合体の新規結合タンパク質の探索

バルデー・ビードル症候群は繊毛の機能異

常が原因の遺伝病で、多指症、病的肥満、精神遅滞などの症状を呈する。現在までに原因遺伝子として BBS1-19 が同定されている。そのうち 8 つは BBSome 複合体のサブユニットをコードしている。BBSome 複合体は繊毛内タンパク質輸送を制御していると予想されているが、詳細な機能は不明である。そこで、BBSome 複合体の機能を解明する糸口として、新規の結合タンパク質を同定し、その機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法によるタンパク質間相互作用解析

HEK293T 細胞に HA 標識した RabL2 と EGFP 標識した Cep19 を共発現させ、その細胞溶解液に GTP、GDP、EDTA のいずれかを加えた。さらにグルタチオンセファロース・ビーズに固定した GST-抗 GFP 抗体を加え、EGFP-Cep19 を沈降させた。沈降物中のタンパク質について、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングをおこない RabL2 の結合を調べた。

(2) RabL2 と Cep19 の細胞内局在の観察

hTERT-RPE1 細胞における内在性の RabL2 と Cep19 の局在、および EGFP 標識した RabL2 と RFP 標識した Cep19 の局在を免疫染色法によってオルガネラマーカーと比較した。また、hTERT-RPE1 細胞を血清含有培地で細胞密度が 100%になるまで培養した後に、無血清培地で 24 時間培養して繊毛を形成させた状態での RabL2 と Cep19 の局在を同様に観察した。

(3) Cep19 の欠失変異体の解析

Cep19 アミノ酸配列の N 末端から 30、60、90 アミノ酸ずつ欠失させた変異体、および C 末端から 17、47、77 アミノ酸ずつ欠失させた変異体を作製した。次に、EGFP 標識した Cep19 欠失変異体と RabL2-HA との相互作用を上記の共免疫沈降実験によって調べた。また、RFP 標識した Cep19 欠失変異体の細胞内局在を上記と同様にして調べた。さらに、hTERT-RPE1 細胞において RabL2-EGFP と RFP-Cep19 の欠失変異体を共発現させ、両者の細胞内局在を比較した。

(4) CRISPR/CAS9 システムによる Cep19 ノックアウト細胞の樹立

Cep19 遺伝子を標的とする gRNA を設計し、CAS9 タンパク質と gRNA の両方を発現させることが可能なプラスミドベクターに組み込んだ。また、ドナーベクターとして、ネオマイシン耐性遺伝子と青色蛍光タンパク質に核局在シグナルを付加した融合タンパク質を持ったプラスミドも作製した。これらのプラスミドを hTERT-RPE1 細胞にトランスフェクションし、ホモロジー非依存的修復機構を介して Cep19 遺伝子部位にドナーベクターをノックインした。薬剤選択をおこなった後、ゲノム編集された細胞をクローン化した。そ

これらの細胞からゲノム DNA を抽出して PCR をおこない、Cep19 遺伝子部位にドナーベクターが挿入され、Cep19 遺伝子がノックアウトされていることを確認した。樹立した Cep19 ノックアウト細胞株を用いて、内在性 RabL2 の局在を免疫染色法により観察した。

(5) 酵母ツーハイブリッドスクリーニングによる結合タンパク質の探索

BBS1 または BBS2 をベイトベクターにクローニングし酵母に導入した。プレイライブラリーを持った酵母と接合させ、いくつかのアミノ酸含まない選択培地上で培養した。ポジティブクローンを単離し、プラスミドを精製したあと遺伝子配列を解読した。

4. 研究成果

(1) Rab-Like ファミリーの細胞内局在の観察
ヒト RabL2-5 をクローニングし、hTERT-RPE1 細胞に発現させて細胞内局在を観察したところ、RabL2 が中心体や繊毛の基底小体に局在することが判明した。そのため、繊毛との関連が示唆された RabL2 についてより詳しく機能解析をおこなうことにした。

(2) RabL2 結合タンパク質の探索

網羅的な酵母ツーハイブリッドスクリーニングのデータベースを検索したところ、RabL2 が中心体局在タンパク質である Cep19 と結合するという情報を見いだした。Cep19 は中心体に局在する新規のタンパク質として同定されていたが、その機能は全く不明であった。RabL2 と Cep19 はどちらも中心体に局在するため、両者の結合は繊毛での機能と関係があるのではないかと予想した。

(3) RabL2 と Cep19 の相互作用解析

RabL2 は分子スイッチとして機能する低分子量 GTPase であるため、活性化型 (GTP 結合型) と不活性化型 (GDP 結合型) の 2 つの状態をとる。そこで、どちらの状態の RabL2 が Cep19 と結合するのかを調べた。EGFP-Cep19 と RabL2-HA を共発現させ、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降すると、RabL2-HA は GTP の存在下でも GDP の存在下でも結合していた。しかし、EDTA を加えて Mg²⁺ をキレートし、RabL2 をヌクレオチドフリーの状態にすると結合しないことがわかった。したがって、RabL2 は GTP と GDP の結合型にかかわらず常に Cep19 と相互作用し、複合体を形成していると考えられる。

(4) RabL2 と Cep19 の細胞内局在の観察

内在性の RabL2 と Cep19、および蛍光タンパク質と融合させて発現させた RabL2 と Cep19 は、いずれも中心体および繊毛基部の基底小体に局在していた。

(5) Cep19 の変異体の解析

Cep19 の N 末端領域を欠失させた変異体は中

心体に局在しなくなった。一方、C 末端領域を欠失させた Cep19 変異体は RabL2 と結合しなくなった。さらに、これらの N 末端欠失変異体、C 末端欠失変異体を RabL2 と共発現させると、RabL2 が中心体に局在しなくなった。このことから、RabL2 が中心体に局在するためには、RabL2 が Cep19 と結合すること、Cep19 が中心体に局在することが必要であると考えられる。

(6) Cep19 ノックアウト細胞での RabL2 の局在変化

CRISPR/CAS9 システムによって Cep19 遺伝子をノックアウトした細胞株を樹立した。ノックアウト細胞では RabL2 が中心体に局在しなくなった。このことから、RabL2 が中心体に局在するためには Cep19 が必要であると考えられる。

RabL2 は GTP 結合型と GDP 結合型にかかわらず Cep19 と結合し、Cep19 によって中心体/基底小体にリクルートされることが明らかになった。これらの結果から、Cep19 は RabL2 のエフェクター分子であるというよりは、中心体に局在するための足場タンパク質のような機能を果たしている可能性が考えられる。

最近になって、不妊マウスの原因遺伝子の一つが RabL2 であり、その変異によって精子の鞭毛運動が異常になるという報告や、Cep19 のノックアウトによってマウスの精子の鞭毛運動が異常になるという報告がなされた。これらの論文と今回の実験結果を総合すると、RabL2 は Cep19 に結合することによって中心体/基底小体にリクルートされ、そこで何らかのエフェクター分子と相互作用して、鞭毛運動を制御している可能性が考えられる。また、Cep19 ノックアウトマウスは病的肥満という繊毛病に特有の症状を呈することから、運動性繊毛だけでなく一次繊毛の機能においても重要な役割を果たすと予想される。

(7) BBSome 複合体の新規結合タンパク質の探索

BBS1 と BBS2 をベイトにした酵母ツーハイブリッドスクリーニングをおこなったが、繊毛に関係がある新規の結合タンパク質を見つけることはできなかった。その原因として、ヒトの BBS タンパク質が酵母では正常に発現しないことが考えられる。BBSome 複合体の形成にはシャペロンタンパク質が必要であるため、正常に折りたたまれたタンパク質を発現させるためには哺乳動物細胞が適していると考えた。実際に、ヒト由来の培養細胞である HEK293T 細胞では BBS タンパク質を正常に発現させることができた。しかし、培養細胞を使った実験においても新規の結合タンパク質の同定には至らなかった。

本来の目的とは異なるが、この研究の過程

で、Visible immunoprecipitation (VIP) アッセイというタンパク質間相互作用を簡便に調べることができる新しい実験手法を開発することができた。VIP アッセイを用いることで、これまで不明だったBBSサブユニット間の完全な相互作用マップを明らかにすることに成功した。

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 2件)

Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R. & Nakayama, K. (2015) Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. *J. Cell Sci.*, 128, in press. 査読有 DOI: 10.1242/jcs.168740

加藤洋平 IFT トレインの方向転換機構
ファルマシア 2015年 51巻 1号 p62
査読 無し
<http://farumashia.pharm.or.jp/mokuj/2015/51-01.html>

[学会発表](計 11件)

加藤洋平、野崎梢平、寺田将也、中山和久
Multisubunit complex architectures revealed by visible immunoprecipitation (VIP) assay using fluorescent fusion proteins. The 18th iCeMS International Symposium/The 15th International Membrane Research Forum. 京都大学 (京都府) 2015年3月3日

萩谷遥平、寺田将也、加藤洋平、中山和久
複合体を形成して中心体/基底小体に局在する Rab-Like2 と Cep19 の機能の解析. 第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都府) 2014 年 10 月 18 日

小林美菜子、久保慶治、加藤洋平、高橋千絵、中山和久
VAMP2 と SNAP23/25 が媒介するリサイクリング小胞と細胞膜の融合の調節. 第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都府) 2014 年 10 月 17 日

八木智佳子、加藤洋平、中山和久 (2014)
一次繊毛への輸送において機能する SNARE タンパク質のライブセルイメージングによる探索. 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2014、富山国際会議場 (富山県) 2014 年 9 月 21 日

小林美菜子、久保慶治、高橋千絵、加藤洋平、中山和久
VAMP2 と SNAP23/25 によるリサイクリング小胞と細胞膜の融合の調節. 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2014、富山国際会議場 (富山県) 2014 年 9 月 20 日

加藤洋平、Hartanto David、宮野吏永、中山和久
BBSome 複合体構築における BBIP10/BBS18 の役割. 第 66 回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂 (奈良県) 2014 年 6 月 12 日

小林美菜子、久保慶治、高橋千絵、加藤洋平、中山和久
Rab11、Exocyst 複合体、および SNARE 第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム 2013、東京大学 (東京都) 2013 年 9 月 14 日

久保慶治、小林美奈子、高橋千絵、加藤洋平、中山和久
Rab11、exocyst 複合体、および SNARE タンパク質による輸送小胞の細胞膜との繫留/融合過程の調節. 第 65 回日本細胞生物学会大会. ウィンクあいち (愛知県), 2013 年 6 月 21 日

加藤洋平、宮野吏絵、中山和久
Determination of Domain-Domain Interactions Required for BBSome Formation. The 25th CDB Meeting: Cilia and Centrosomes, from Fertilization to Cancer, 理研 CDB (兵庫県) 2013 年 6 月 18 日

加藤洋平、高津宏之、中山和久
Mitosis-coupled, Microtubule-dependent Clustering of Endosomal Vesicles around Centrosomes. The 25th CDB Meeting: Cilia and Centrosomes, from Fertilization to Cancer, 理研 CDB (兵庫県) 2013 年 6 月 17 日

加藤洋平、高津宏之、中山和久
細胞分裂時における微小管依存的な中心体方向へのエンドソームの流れ. 第 60 回日本生化学会近畿支部例会、大阪大学 (大阪府) 2013 年 5 月 18 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/physchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 洋平 (KATOH YOHEI)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 90568172