

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770136

研究課題名(和文) 一次線毛の短縮とそれを介した細胞周期制御に関わる分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of primary ciliary resorption and cilia-dependent cell cycle regulation.

研究代表者

斎藤 将樹 (Saito, Masaki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50400271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：一次線毛は細胞外に突出した細胞外環境の受容器であり、細胞周期がG0期のときに一細胞あたり一本存在現れる。一次線毛の形成・短縮の異常は一次線毛機能不全症を引き起こす。私のそれまでの研究より、細胞質ダイニン軽鎖Tctex-1がリン酸化すると一次線毛の短縮が引き起こされることが示されたものの、その短縮機構には不明な点が多く残されていた。本研究成果により、リン酸化Tctex-1によってアクチン重合およびエンドソーム形成が引き起こされると、一次線毛の短縮および細胞周期の再駆動が誘導されることが見出された。また、エンドソーム形成に関わるクラスリンが、一次線毛の近傍に分布することも見出された。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia are nonmotile sensory organelles presented during the G0 phase of many cell types, and act as cellular antennae to receive a variety of environmental stimuli. Disruption of cilia function results in numerous human diseases and genetic disorders collectively called 'ciliopathies'. Although primary cilia are essential for sensing, little is known about the cellular machinery controlling the resorption of cilia. I previously showed that phosphorylation of Tctex-1, one of a light chain of cytoplasmic dynein complex, played an important role in resulting primary ciliary resorption. In the present study, I further suggested that Tctex-1 regulated primary ciliary resorption and cell cycle reentry through actin polymerization and endosome formation. Clathrin, a molecule involved in endosome formation, was distributed on periciliary region.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：一次線毛 細胞周期 細胞質ダイニン軽鎖 アクチン重合 エンドソーム形成 低分子量Gタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

一次線毛は、ほとんど全ての真核細胞に一細胞あたり一本存在し、細胞外に突出した長さ数  $\mu\text{m}$  の細胞小器官である。一次線毛の異常は細胞増殖や分化などに異常を来し、多発性嚢胞症、多指症や小頭症などの一次線毛機能不全症の発症に繋がる。一次線毛は細胞周期の  $G_0$  期に中心体に類似の基底小体から形成され、また、細胞外から刺激を受け取ると短縮すると共に細胞周期が再駆動する。そのため、一次線毛の形成および短縮は細胞周期と関連があると考えられている。

Tctex-1 は細胞内物質輸送に関わる細胞質ダイニン複合体の軽鎖であり、副甲状腺ホルモン受容体 (Sugai and Saito et al., Biochem Biophys Res Commun, 2003) などの細胞内輸送に参与する。しかし近年、Tctex-1 はリン酸化されると細胞質ダイニン複合体から遊離し、低分子量 G タンパク質の活性化を介して神経軸索形成の促進に参与することが報告された (Chuang et al., Dev Cell, 2005)。このことから、細胞質ダイニン複合体非依存的な Tctex-1 の役割が注目され始めた。

私は以前、Tctex-1 の T94 がリン酸化すると、Tctex-1 が一次線毛の短縮および細胞周期の再駆動の制御に参与することを見出した (Li and Saito et al., Nat Cell Biol)。さらに私は、(a) Tctex-1 のリン酸化とそれに引き続くアクチン重合によって一次線毛の短縮が制御されること、および (b) エンドソーム形成が一次線毛の短縮に参与する結果を得ていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、一次線毛機能不全症の根幹的な分子制御機序を解明することを目的とし、一次線毛の短縮と細胞周期の再駆動を制御する分子機構を解析する。

具体的には、Tctex-1 リン酸化によってアクチン重合が引き起こされるための分子機構の検討、Tctex-1 リン酸化がエンドソーム形成を制御するかどうかの検討、およびエンドソームが形成される細胞内局所の同定を行う。また、一次線毛を介した細胞周期の再駆動におけるアクチン重合およびエンドソーム形成の役割について検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞培養：ヒト網膜色素上皮細胞株 (telomerase-immortalized human retinal pigment epithelia; RPE-1 細胞) は、10%血清存在下に DMEM-F12 培地中で培養した。プラスミド DNA のトランスフェクションには、電気穿孔法を用いた。

(2) shRNA プラスミドの作製：標的タンパク質をノックダウンするための shRNA プラスミドは、U6 プロモーターを組み込んだ pCAGIG ベクター中にターゲット遺伝子を挿入することで作製した。pCAGIG ベクターには緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) をコードする遺伝子が含まれており、プラスミドがトランスフェクションされた細胞で発現する。

(3) 一次線毛の形成および短縮の誘導：RPE-1 細胞に shRNA プラスミドをトランスフェクションした12時間後、培地を無血清 DMEM 培地に置き換えた。この細胞を 48 時間培養することによって細胞周期を  $G_0$  期に同調し、一次線毛の形成を誘導した。その後、10%血清を含む DMEM-F12 培地に置き換え、一次線毛の短縮を誘導した。一定時間後、細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて固定した。

(4) 一次線毛陽性細胞数の測定：固定された細胞の一次線毛は、抗アセチル化チュブリン抗体を用いて蛍光標識した。トランスフェクションされた細胞内で発現する GFP は、抗 GFP 抗体によって蛍光強度を増幅した。また、細胞の核は DAPI を用いて蛍光標識した。全細胞のうち一次線毛陽性細胞の数を蛍光顕微鏡下に計測した。また、蛍光染色細胞の撮影には共焦点蛍光顕微鏡を用いた。

(5) 細胞内タンパク質発現量の解析：shRNA プラスミドによる標的タンパク質のノックダウン効率、抗標的タンパク質抗体を用いたウェスタンブロット法にて解析した。タンパク質の検出には Odyssey Infrared scanner (LI-COR, Lincoln, NE, USA) を用いて検出した。

## 4. 研究成果

(1) Tctex-1 を介した一次線毛短縮および細胞周期再駆動におけるアクチン重合の役割。

一次線毛の短縮における Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の役割。RPE-1 細胞に Cdc42 不活性化変異体を過剰発現させると、血清刺激依存性の一次線毛短縮が抑制されたが、Rac1 不活性化変異体では影響されなかった。また、Tctex-1 のノックダウンによって抑制された短縮は、Cdc42 活性化変異体の過剰発現によってレスキューされた。

一次線毛の短縮におけるアクチン重合調節タンパク質 ARPC2 の役割。Arp2/3 複合体サブユニット ARPC2 のノックダウンによって、一次線毛の短縮が抑制された。また、ARPC2 ノックダウンによる短縮の抑制は Tctex-1 リン酸化変異体 (活性化変異体) の過剰発現によってレスキューされなかった。

一次線毛の短縮におけるアクチン重合調節タンパク質アネキシン  $A_2$  の役割。一次線毛の短縮は、アネキシン  $A_2$  のノックダウンによって抑制された。また、その抑制は Cdc42 活性化変異体の過剰発現によってレスキューされなかった。

細胞周期調節における ARPC2 およびアネキシン A<sub>2</sub> の役割。ARPC2 およびアネキシン A<sub>2</sub> のノックダウンにより、細胞周期マーカー Ki67 の陽性細胞数が減少した。

これらの結果より、Tctex-1 が活性化されることにより、Cdc42、ARPC2 およびアネキシン A<sub>2</sub> を介して一次線毛の短縮が引き起こされることが示された。また、およびその一次線毛の短縮によって細胞周期が制御されることが示唆された。

(2) Tctex-1 を介した一次線毛短縮および細胞周期再駆動におけるエンドソーム形成の役割。

一次線毛の短縮における早期エンドソーム形成の役割。クラスリンおよびダイナミンは、早期エンドソーム形成に参与する。そこで、クラスリンをノックダウンすることによって、あるいはダイナミンの機能を特異的阻害薬によって抑制することによって、一次線毛の短縮はそれぞれ抑制された。また、クラスリンのノックダウンによる短縮抑制は、Tctex-1 リン酸化変異体の過剰発現によってレスキューされなかったことより、Tctex-1 のリン酸化とそれに引き続く早期エンドソーム形成が、一次線毛の短縮に参与することが考えられた。

一次線毛の短縮における後期エンドソーム形成の役割。Rab7 は後期エンドソームの形成に参与する。そこで、Rab7 の活性変異体および不活性変異体を過剰発現したが、血清刺激依存性の一次線毛短縮に影響は見られなかった。これより、後期エンドソーム形成は一次線毛の短縮には直接的には関与しない可能性が示された。

細胞周期調節におけるエンドソーム形成の役割。細胞周期マーカー Ki67 の陽性細胞数は、ダイナミン特異的阻害薬によって減少した。このことから、一次線毛を介した細胞周期調節は、エンドソーム形成によって制御されることが示唆された。

以上のことから、Tctex-1 によってクラスリンおよびダイナミン依存的な早期エンドソームの形成が引き起こされることによって、一次線毛の短縮と細胞周期の再駆動が制御されることが示唆された。一方、早期エンドソームから後期エンドソームへの形成は、短縮への関与が認められなかった。

(3) 一次線毛の短縮過程におけるエンドソーム形成部位。

一次線毛の短縮過程でエンドソームが形成される細胞内微小領域を見出すため、エンドソーム形成に必須のクラスリン分子に注目した。その結果、クラスリン軽鎖および重鎖が一次線毛の周囲に局在することが分かった。すなわち、ciliary pocket と呼ばれる一次線毛を取り囲む膜ドメインにクラスリンが局在しており、エンドソームを形成することが考えられた。すなわち、ciliary pocket

でエンドソームが形成されることが、一次線毛の短縮と細胞周期の再駆動に参与すると考えられる。

以上の結果より、Tctex-1 がリン酸化することにより、アクチン重合および早期エンドソーム形成が制御されることで、一次線毛の短縮とそれに引き続く細胞周期の再駆動が誘導されることが示唆された。

## 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 5 件)

- (1) Celine Yeh, Aiqun Li, Jen-Zen Chuang, Masaki Saito, Alfred Carceres, Ching-Hwa Sung, IGF-1 activates a cilium-localized non-canonical G $\beta$ y signaling pathway that regulates cell cycle progression, *Developmental Cell*, **26**, 358-368 (2013)  
DOI: 10.1016/j.devcel.2013.07.014
- (2) Toshihiro Goto, Ayano Chiba, Jun Sukegawa, Teruyuki Yanagisawa, Masaki Saito\*, Norimichi Nakahata, Suppression of adenylyl cyclase-mediated cAMP production by plasma membrane associated cytoskeletal protein 4.1G, *Cellular Signaling*, **25**, 690-697 (2013) (\*; corresponding author)  
DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.11.020
- (3) Shinji Goto, Masaki Saito, Yutaro Obara, Takahiro Moriya, Norimichi Nakahata, Involvement of lipid rafts in multiple signal transductions mediated by two isoforms of thromboxane A<sub>2</sub> receptor: dependency on receptor isoforms and downstream signaling, *European Journal of Pharmacology*, **693**, 15-24 (2012)  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.07.046
- (4) Punnee Nusuetrong, Masaki Saito\*, Haruhisa Kikuchi, Yoshiteru Oshima, Takahiro Moriya, Norimichi Nakahata, Apoptotic effects of satratoxin H is mediated through DNA double-stranded break in PC12 cells, *Journal of Toxicological Sciences*, **37**, 803-812 (2012) (\*; corresponding author)  
DOI: 10.2131/jts.37.803
- (5) Aiqun Li, Masaki Saito, Jen-Zen Chuang, Yun-Yu Tseng, Carlos Dedesma, Kazuhito Tomizawa, Taku Kaitsuka, Ching-Hwa Sung, Ciliary transition zone activation of phospho-Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase re-entry and fate of neural progenitors, *Nature*

[学会発表](計 10 件)

- (1) 齋藤将樹、「Cholesterol inhibition of phospholipid scrambling in human erythrocyte membranes through its suppression of PLSCR1 activity」2013 Red Cell Club Meeting、平成 25 年 10 月 4-5 日 (New York Blood Center, New York, NY, USA).
- (2) 齋藤将樹、萬野純恵、高桑雄一、「Phospholipid scramblase 1 (PLSCR1) を介したリン脂質の scrambling 機構の検討」第 85 回日本生化学会大会、平成 25 年 9 月 11-13 日 (横浜)
- (3) 齋藤将樹、萬野純恵、高桑雄一、「Phospholipid scramblase 1 を介するリン脂質 scrambling におけるヒト赤血球膜コレステロールの抑制効果の検討」第 55 回日本脂質生化学会大会、平成 25 年 6 月 6-7 日(宮城・松島)
- (4) 齋藤将樹、萬野純恵、高桑雄一「膜リン脂質非対称性の維持機構における膜コレステロールの役割」日本膜学会第 35 年会、平成 25 年 5 月 20-21 日 (東京・早稲田大学)
- (5) 齋藤将樹、新敷信人、萬野純恵、高桑雄一、「コレステロールによる細胞膜リン脂質非対称性制御機構」第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 14-16 日 (福岡)
- (6) 市川明彦、森田正行、齋藤将樹、佐藤輝紀、鈴木享、中山瑞穂、久場敬司、今井由美子、「マウス肺組織における Damage associated molecular patterns (DAMPs) DNA の in vivo イメージング -急性肺損傷モデルでの検討」第 62 回日本薬理学会北部会、平成 23 年 9 月 29-30 日 (仙台)
- (7) 森田正行、久場敬司、齋藤将樹、中山瑞穂、鈴木享、門脇歩美、市川明彦、有田誠、河岡義裕、今井由美子、「インフルエンザ感染マウス肺のリピドミクス解析」第 62 回日本薬理学会北部会、平成 23 年 9 月 29-30 日 (仙台)
- (8) 齋藤将樹、森田正行、市川明彦、鈴木享、中山瑞穂、竹縄忠臣、久場敬司、今井由美子、「ホスホイノシタイド・5-ホスファターゼのインフルエンザ感染における役割」第 62 回日本薬理学会北部会、平成 23 年 9 月 29-30 日 (仙台)
- (9) 後藤慎二、齋藤将樹、小原祐太郎、守屋孝洋、中畑則道、「トロンボキサン A<sub>2</sub> 受容体シグナルにおける脂質ラフトの役割」第 62 回日本薬理学会北部会、平成 23 年 9 月 29-30 日 (仙台)
- (10) 齋藤将樹、Jen-Zen Chuang、中畑則道、久場敬司、今井由美子、Ching-Hwa Sung、「Tctex-1 はアクチン重合を介して一次繊毛の短縮を制御する」

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 将樹 ( SAITO Masaki )  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 50400271

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :