

令和元年6月11日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15119

研究課題名(和文)新規一次繊毛膜タンパク質の機能探究

研究課題名(英文)Functional research of a novel protein comprising ciliated membrane

研究代表者

西 晶子(NISHI, Akiko)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：50772422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膜タンパク質Prom1は細胞膜突起に局在し、その変異は遺伝性眼科疾患である網膜色素変性症を誘発するが、その機能は分かっていない。本研究では、Prom1の過剰発現時に細胞膜突起が生じることに着目し、細胞膜突起形成におけるProm1の機能解明を目的とした。その結果、Prom1過剰発現による細胞膜突起形成はコレステロール依存的であり、Prom1のカルボキシル末端領域に位置する5アミノ酸残基が必須であった。また突起形成の初期に活性型RhoAが重要であった。さらにProm1はカルシウムイオンによって誘発される塩化物イオンの流出に必要であり、突起形成は塩化物の流出活性と密接に関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Prom1遺伝子異常が遺伝性眼科疾患である網膜色素変性症やスターガルト病を誘発することが報告された。このことにより、Prom1タンパク質の重要性は発生過程の幹細胞だけではなく、視細胞における恒常性機能維持の局面でも必須の役割を果たすことが示唆されている。しかし、Prom1タンパク質の機能解析は進んでおらず、Prom1が眼科疾患を引き起こす直接の原因や、Prom1が惹起する細胞内シグナル経路については不明な点が多い。本研究において、Prom1における突起形成機構と塩化物イオンの流出活性という新たな機能を提唱したことにより、治療に向けた基礎が構築された。

研究成果の概要(英文)：The membrane protein Prominin-1 (Prom1) is known to localize to the protrusions. Mutation(s) in Prom1 gene is causative for retinitis pigmentosa, which is a hereditary retinal disease, however, the underlying mechanism(s) have been elusive. Based on the previous finding that the over-expression of Prom1 induced cell membrane protrusions, in this study, I sought to elucidate the mechanism of cell membrane protrusion formation mediated by Prom1. Firstly, Prom1-induced protrusions were formed in a manner dependent cholesterol. Secondly, with detailed domain mapping of Prom1, five amino acids that is essential for protrusion formation were identified in the carbonyl cytosolic region. Moreover, it was revealed that the small GTPase Rho and its downstream kinase ROCK are essential for Prom1-induced protrusion formation. Eventually, Prom1 was required for the chloride ion efflux induced by calcium ion uptake, which is closely associated with protrusion formation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞膜突起 Rhoシグナル経路 塩化物イオン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Prominin-1 (Prom1) は発生初期から成体に至るまで発現する 5 回膜貫通型の膜タンパク質である。長年、Prom1 は幹細胞マーカーとして使用されてきたが、Prom1 遺伝子異常は遺伝性の眼科疾患である網膜色素変性症とスターガルト病 (Stargardt's disease) を誘発することが報告されて以来、重篤な眼科疾患の原因遺伝子の一つとして認識された (Yang et al., *J. Clin. Invest.* 2008)。このことから、Prom1 は発生過程の幹細胞だけではなく、細胞における恒常性機能維持の局面で必須の役割を果たすことが示唆されている。一方で、Prom1 タンパク質の機能はほとんど分かっていないため詳細な解析が必要である。

2. 研究の目的

膜タンパク質 Prominin-1 (Prom1) の変異は遺伝性の眼科疾患である網膜色素変性症を誘発するが、その機能は分かっていない。予備的な実験から、Prom1 は一次繊毛に局在することを確認し、その欠損において表現型が繊毛に見られたが、新たに繊毛以外にも細胞突起全般に局在することが明らかとなった。そこで本研究では、Prom1 の過剰発現により細胞膜突起が生じることに着目し、Prom1 の細胞膜突起形成機構における役割の解明を目的とした。また、研究代表者らの先行研究により Prom1 がカルシウム作動性塩化物イオンチャネル (CaCC) として報告されているタンパク質と相同性が高いことが示唆されている。そのため、実際に Prom1 が CaCC (あるいはその調節因子) であることを証明し、その機能解析を行うことで Prom1 の細胞膜突起形成機能に影響するかを調べた。

3. 研究の方法

本研究では、Prom1 の細胞膜突起形成機構の解明をするため、以下の解析を行った。はじめに、細胞膜突起が何から形成されているのか、細胞骨格に対する阻害剤で検証する。また、細胞膜突起を生じさせるために必要な Prom1 の領域をドメインマッピングにて明らかにする。次に、細胞膜突起を生じさせるシグナル経路を明らかにするため、Prom1 に関与する PI3K や Src の阻害剤処理や、新たに Prom1 と関与するシグナルに対する阻害剤処理により細胞膜突起に対する影響を解析する。さらに、Prom1 がカルシウム作動性塩化物イオンチャネルであることを証明するために、塩化物イオンの蛍光インジケータとして MQAE を用いて野生型や Prom1 欠損マウス胚から単離した繊維芽細胞における塩化物イオンの変化を経時的に定量する。

4. 研究成果

(1) Prom1 による細胞膜突起形成機構の解明

細胞膜に局在する Prom1 の機能を調べるために過剰発現したところ、正常では見られない長さの細胞膜突起が細胞あたり多数も生じた。これまでに細胞膜突起は微小管由来の繊毛やアクチン由来のサイトニーム (Cytome) が報告されているため、微小管あるいはアクチンに対する阻害剤にて処理したが細胞突起形成に影響は認められなかった。そこで、Prom1 と結合することが知られているコレステロール合成を阻害したところ、細胞膜突起の形成頻度の低下が認められ、細胞膜突起がコレステロール依存的に生じていることが明らかとなった。また、この Prom1 による細胞膜突起は網膜色素変性症を発症した患者由来の変異をもつ Prom1 では生じなかったことから、Prom1 の細胞膜突起形成機能が、網膜における恒常性機能維持において必須の役割を果たすことが示唆された。

また、細胞膜突起を生じさせるために必要な Prom1 の領域をドメインマッピングにて解析したところ、カルボキシル末端領域にある 5 アミノ酸が細胞膜突起形成に必要とされることが明らかとなった。網膜色素変性症の患者由来の変異では終止コドンが生じカルボキシル末端領域が形成されないため、この領域の重要性が示唆された。

(2) 細胞膜突起を生じさせるシグナル経路の解明

細胞膜突起を生じさせるシグナル経路を明らかにするため、これまでに Prom1 と関与することが報告されている PI3K や Src シグナルの阻害剤処理を行ったが、Prom1 過剰発現による細胞膜突起は依然として生じた。この結果と一致して、PI3K シグナルによりリン酸化されるアミノ酸残基に対しリン酸化を受けない変異 Prom1 を発現させた場合でも細胞膜突起は生じた。これらのことから、Prom1 を介して細胞膜突起形成に関与する他のシグナル経路の探索を行った。我々は細胞が移動する時などに細胞膜突起に関わる Rho, Rac そして Cdc42 などの small GTPs に着目し、各阻害剤処理後の Prom1 細胞膜突起能の検証を行った。その結果、Rho/ROCK シグナル経路が Prom1 による細胞膜突起形成に必要であることが明らかとなった。

(3) Prom1 がカルシウム作動性塩化物イオンチャンネルに関与することの実証

Prom1 がカルシウム作動性塩化物イオンチャンネルであることを証明するため、野生型や Prom1 欠損マウス胚から単離した繊維芽細胞において塩化物イオンの蛍光インジケータとして MQAE を取り込ませ、細胞内のカルシウムイオンをイオノフォア処理することで増加させた時の塩化物イオンの変化を経時的に定量した。その結果、Prom1 欠損繊維芽細胞において、塩化物イオンの流出は低下したことから、Prom1 は細胞内カルシウムイオン取り込み時に塩化物イオンの流出を促進することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Akiko Hori, Kenji Nishide, Yuki Yasukuni, Kei Haga, Wataru Kakuta, Yasuyuki Ishikawa, Matthew J Hayes, Shin-ichi Ohnuma, Hiroshi Kiyonari, Kazuhiro Kimura, Toru Kondo and Noriaki Sasai, Membrane Protrusion Formation Mediated by Rho/ROCK Signalling and Modulation of Chloride Flux. (2019) **BioRxiv** (DOI: <https://doi.org/10.1101/600379>) 査読なし
2. Atsuki Yatsuzuka, Akiko Hori, Minori Kadoya, Mami Matsuo-Takasaki, Toru Kondo, Noriaki Sasai. GPR17 is an essential component of the negative feedback loop of the Sonic Hedgehog signalling pathway in neural tube development. (2018) **BioRxiv** (DOI: <https://doi.org/10.1101/424598>) 査読なし

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Atsuki yastuzuka, Akiko Nishi, Minori Kadoya, Noriaki Sasai. GPR17 us an essential component of the negative feedback loop of the sonic hedgehog signaling pathway in neural tube development. 【ASCB/EMBO 2018 meeting】, 2018.12.11, Sandiego, USA.
2. Akiko Nishi, Toru Kondo, Noriaki Sasai. Regulation of cell morphology by the membrane glycoprotein Prominin-1. 【ASCB/EMBO 2018 meeting】, 2018.12.10, Sandiego, USA.

3. 井上亜美, 西 晶子, 市川朋, 笹井 紀明. ソニック・ヘッジホッグシグナルによる細胞の増殖・分化制御メカニズム. 【第41回日本分子生物学会年会】, 2018.11.28, Yokohama, Japan.
4. 西 晶子, 西出 賢次, 近藤 亨, 笹井 紀明. Prominin-1 による細胞突起形成のメカニズム. 【第41回日本分子生物学会年会】, 2018.11.28, Yokohama, Japan.
5. 角田 航人, 西 晶子, 笹井 紀明. 眼疾患の原因遺伝子 Prominin-1 の変異細胞の作製. 【第41回日本分子生物学会年会】, 2018.11.27, Yokohama, Japan.
6. Atsuki Yatsuzuka, Akiko Hori-Nishi, Noriaki Sasai. The novel G-protein coupled receptor GPR17 is the negative feedback component of the Sonic Hedgehog pathway in the neural tube development. 【第51回日本発生生物学会】2018.06.05. Tokyo, Japan.
7. Atsuki Yatsuzuka, Akiko Nishi, Minori Kadoya, Mami Matsuo-Takasaki, Toru Kondo, Noriaki Sasai. GPR17 is an Essential Component of the Negative Feedback Loop of the Sonic Hedgehog Signalling Pathway in Neural Tube Development. 【22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience】, 2018.05.22, Ikoma, Japan.
8. Akiko Nishi, Toru Kondo, Noriaki Sasai. Regulation of cell morphology by the membrane glycoprotein Prominin-1. 【A Joint Biochemical Society and BSCB Scientific Meeting, The Dynamic Cell III】, 2018.03.19, Manchester, UK.
9. Akiko Nishi, Yuki Yasukuni, Kenji Nishide, Toru Kondo, Noriaki Sasai. Cell membrane protrusions induced by ectopic expression of Prominin-1. 【生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)】, 2017.12.07, Kobe, Japan.
10. 八塚 敦輝, 西 晶子, 笹井 紀明. GPR17によるソニックヘッジホッグシグナルの負のフィードバック制御機構が与える神経管パターン形成への影響. 【生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)】, 2017.12.07, Kobe, Japan.
11. Akiko Nishi, Yuki Yasukuni, Kenji Nishide, Toru Kondo, Noriaki Sasai. 膜タンパク質 Prominin-1 による細胞の形態形成における役割. 【第69回日本細胞生物学会大会】, 2017.06.13, Sendai, Japan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://bsw3.naist.jp/sasai/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。